

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-325076

(43)Date of publication of application : 28.11.2000

(51)Int.Cl.

C12N 5/06
C12N 1/33
// C12N 15/09

(21)Application number : 11-141904

(71)Applicant : HARA TOSHIO

(22)Date of filing : 21.05.1999

(72)Inventor : HARA TOSHIO
TARUI HIROSHI

(54) CELL-FREE EXTRACT AND GLYCOPROTEIN SYNTHETIC SYSTEM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prepare a cell extract having translation activities and sugar-modifying activities.

SOLUTION: Insect cells are stored in a small gas cylinder, and the small gas cylinder is charged with nitrogen gas to pressurize the cylinder. The charged gas is exhausted at once to crush the cells and to provide the objective cell extract. Not only a translation factor but also a factor carrying sugar-modifying activities can be recovered by the method, because the method is the one milder than the conventional cell-crushing method by using a homogenizer. As a result, an in-vitro glycoprotein synthesizing system capable of carrying out from the translation to the sugar-modification after the translation can be produced.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 30.03.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3713402

[Date of registration] 26.08.2005

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The cell-free extract characterized by crushing a cell, being prepared, being the cell-free extract which has the activity which makes protein compound from a mold nucleic acid, making said cell in the ambient atmosphere of inert gas, and under pressurization decompress, and crushing said cell.

[Claim 2] The cell-free extract according to claim 1 characterized by said cell being an animal cell.

[Claim 3] The cell-free extract according to claim 1 or 2 characterized by supplying an inert gas air current into an ambient atmosphere, being pressurized, and discharging and decompressing said inert gas out of an ambient atmosphere.

[Claim 4] The cell-free extract according to claim 1 to 3 characterized by said inert gas being nitrogen.

[Claim 5] The cell-free extract characterized by to crush the cell which has protein synthesis activity and the sugar chain qualification activity which adds a sugar chain to the compounded protein, to be prepared, to be the cell-free extract which can compound glycoprotein from a mold nucleic acid, to make said cell in the ambient atmosphere of inert gas, and under pressurization decompress so that the protein synthesis activity and the sugar qualification activity which said cell has may be saved, and to crush said cell.

[Claim 6] The cell-free extract according to claim 5 characterized by said cell being the insect origin.

[Claim 7] The cell-free extract according to claim 5 or 6 characterized by supplying an inert gas air current into an ambient atmosphere, being pressurized, and discharging and decompressing said inert gas out of an ambient atmosphere.

[Claim 8] The cell-free extract according to claim 5 to 7 characterized by said inert gas being nitrogen.

[Claim 9] The cell-free extract according to claim 5 to 8 to which the pressure at the time of said pressurization is characterized by being 2 - 14 kgf/cm².

[Claim 10] The cell-free extract according to claim 5 to 9 characterized by being crushed where said cell is prepared [ml] in 0.25 to 1.5x10⁸ pieces /.

[Claim 11] The constituent for acellular glycoprotein composition characterized by for the cell-free extract indicated by claims 5-10 being added by the cell-free extract which has the protein synthesis activity which compounds protein from a mold nucleic acid, supplementing it with sugar qualification activity, and being able to compound glycoprotein from a mold nucleic acid.

[Claim 12] The constituent for acellular glycoprotein composition according to claim 11 with which the cell-free extract which has said protein synthesis activity is characterized by being either of claims 1-4.

[Claim 13] The glycoprotein composition system by which it has a mRNA composition means make DNA to mRNA which carried out the code of the protein by which sugar-chain qualification may be carried out imprint, and the glycoprotein composition means which can compound glycoprotein from mRNA compounded by the mRNA composition means including the cell-free extract according to claim 5, and the glycoprotein by which sugar-chain qualification was carried out with said glycoprotein composition means is compounded based on mRNA imprinted from DNA by said mRNA composition means.

[Claim 14] DNA which carried out the code of said protein by which sugar chain qualification may be carried out is inserted in a promoter's lower stream of a river, and it has further the expression

vector which makes mRNA discover from said DNA. To said expression vector It is the array in which an untranslation region is made to add to mRNA compounded by the manifestation from said promoter. The glycoprotein composition system according to claim 13 characterized by having the untranslation region array which is the proteinic gene origin by which sugar chain qualification may be carried out by intracellular [which was used for preparation of said cell-free extract].

[Claim 15] The glycoprotein composition system according to claim 14 characterized by for said cell being an insect cell and the promoter in said expression vector and an untranslation region being the virus origins which make said insect cell a host.

[Claim 16] The acellular glycoprotein composition system according to claim 15 which said virus is a baculovirus and is characterized by said promoter and an untranslation region array being the PORIHE drine compounds origins of a baculovirus.

[Claim 17] Glycoprotein generated using the cell-free extract according to claim 5 to 10.

[Claim 18] The cell-free extract manufacturing installation equipped with the gas-supply section which is equipment for manufacturing the cell-free extract which crushes the cell which has protein-synthesis activity and can compound protein from a mold nucleic acid, and is filled up with inert gas in the container which holds said cell, and said container, and the pressure control section which make decompress after pressurizing the pressure in said container so that the cell in said container may crush, where the protein-synthesis activity which said cell has is held.

[Claim 19] The cell extract manufacturing installation according to claim 18 characterized by making it decompress after pressurizing the pressure in said container so that it may have the sugar chain qualification activity which makes a sugar chain add to the protein with which said cell was compounded further and the cell in said container can be crushed, where the protein synthesis activity and sugar chain qualification activity which said cell has [said pressure control section] are held.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Field of the Invention] This invention relates to the system which is made to perform especially both protein synthesis and subsequent sugar chain qualification by the cell extract, and can compound glycoprotein about the in vitro translation system which makes protein compound out of a cell using a cell extract.

[0002]

[Description of the Prior Art] Functional information in the living body is recorded on a nucleic acid, by using this nucleic acid as mold, the protein which is a functional molecule is translated or a functional RNA molecule (for example, ribozyme) is imprinted. In recent years, analysis of the nucleic acid which supported such a living body function, and protein is advanced briskly, and, on the other hand, the analysis approach of these nucleic acids and protein and development of an analysis means are also furthered.

[0003] Especially the analysis approach of a nucleic acid developed splendidly by development of the polymerase chain magnification approach (PCR) etc. According to this PCR, it becomes possible by adding a primer and template DNA in the acellular reaction mixture containing a polymerase enzyme to make the DNA fragment to this template DNA amplify free. That is, about a nucleic acid, it is possible to make it compound and amplify free out of a cell. The decision of the primary structure (base sequence) etc. is presented with the nucleic acid compounded here, and it has come [and] to make advance of nucleic-acid analyses, such as genome analysis, accelerate by this.

[0004] On the other hand, since the protein synthesizing system outside a living body which used the Escherichia coli extract by A.S.Spirin and others (Science, 242, 1162-1164 (1988)) was developed also in the proteinic analysis approach, various acellular translation systems have been developed. There are some which used the cell extract prepared from a wheat germ besides the system of the above-mentioned Escherichia coli, rabbit reticulocyte, etc. as such an acellular translation system, for example.

[0005] Among these, the more general acellular translation system of the wheat germ origin mashes a wheat germ using a mortar etc. with a glass bead, and makes protein compound from mRNA using the cell extract obtained from this mashed wheat germ. That is, it is possible to collect cell extracts from a wheat germ and to make protein compound free out of a cell using this, holding the protein synthesis (translation) activity which exists in this wheat germ.

[0006] Thus, it becomes advantageous, when eliminating the complicated factor and the complicatedness at the time of making protein compound in a cell, becoming possible to obtain desired protein simple and performing proteinic analysis etc., if protein can be made to compound free out of a cell. From such a viewpoint, from before, amelioration of an acellular translation system etc. is made and such a technique is indicated by for example, the Patent Publication Heisei No. 503119 [one to] official report, JP,4-200390,A, JP,7-203984,A, etc. Moreover, it is marketed also as a kit, and it is large and Amasham of such an acellular translation system is available.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, although it is possible by the above-mentioned conventional acellular translation system to perform a translation in protein, there is a problem that posttranslational modification of the translated protein cannot be performed. That is,

in intracellular, proteinic [many of] is translated as protein based on mRNA imprinted from the mold nucleic acid, and receiving qualification after this translation is known. There is sugar chain qualification as one of the qualification after this translation.

[0008] It is thought that the sugar chain added by the sugar chain qualification after this translation is functioning as protection of protein or a stabilizing factor as an own functional regulator of protein as the signal and ligand which participate in the recognition and adhesion between matter and between cells. Therefore, in order to analyze a function in the living body about the protein which receives sugar chain qualification, it is necessary to acquire the protein which received sugar chain qualification.

[0009] Although this sugar chain qualification makes a sugar chain add to proteinic specific amino acid, various those sugar chain qualification reactions differ, and since it is complicated, it is not an easy thing to make a sugar chain add to the protein compounded by the above-mentioned acellular translation system chemically.

[0010] A biochemical approach, i.e., the method of making a sugar chain add to protein using intracellular sugar chain qualification activity using a cell extract like an acellular translation system, is examined from such a problem, and the extract which has the sugar chain qualification activity of the dog organization origin is acquired. This is prepared by collecting the microsome fractions which crush the organization of a dog with a homogenizer and contain a Golgi body by ultra-centrifugal separation.

[0011] The extract of this dog organization is used apart from the conventional acellular translation system. After specifically compounding protein by the acellular translation system and collecting these compound protein, synthetic protein is moved in the extract of said dog organization, and sugar chain qualification is performed. Thus, since the extract of a dog organization was acquired, it became compoundable [glycoprotein] biologically out of the cell. And it is expectable to perform analysis in which the reaction in intracellular was made to reflect more as compared with the protein with which sugar chain qualification compounded by the conventional acellular translation system is not performed by using the glycoprotein compounded here for proteinic functional analysis etc.

[0012] However, in composition of the glycoprotein using the conventional dog organization extract, by the acellular translation system, the protein which made protein compound will be collected and sugar chain qualification will be carried out after that. Thus, when compounding glycoprotein, using separately an acellular translation system and a sugar chain qualification system passes through such two or more processes preferably in the protein which is generally easy to denaturalize, it is also considered that the protein used as a foundation denaturalizes and brings about an activity fall. Moreover, attentiveness advanced also for the operator who operates the protein which is easy to denaturalize etc. is required, and it becomes a complicated activity in compounding glycoprotein in addition to the physical effect on protein, to prepare two steps of above systems and to make glycoprotein compound in two steps using this.

[0013] moreover, the thing of the organization origin now limited like a dog organization becomes usable also about the cell extract which can perform sugar chain qualification — **** — it does not pass but has come to collect sugar chain qualification activity from a universal tissue cell. It is expected that the class of sugar chain changes with cell strains, and a sugar chain qualification reaction changes with cell strains from this. Therefore, if it becomes possible to collect sugar chain qualification activity from various cells, it will also become possible to design proteinic sugar chain qualification free.

[0014] Furthermore, in the medicinal field, although various protein pharmaceutical preparation is developed, about the effectiveness of this protein pharmaceutical preparation, being influenced by the existence of the sugar chain of the protein used as that component, the class, etc. is known for recent years. Therefore, if the sugar chain qualification activity from a cell is variously recoverable, contributing to development of such protein pharmaceutical preparation, amelioration, etc. greatly is expected.

[0015] Then, invention-in-this-application persons inquired wholeheartedly in view of the above-mentioned technical problem about preparation of the cell extract which can perform a series of processes from protein synthesis to sugar chain qualification within one system, enabled preparation of a different new cell-free extract from preparation of the conventional acellular translation system through this research, and made it possible to perform a series of processes from protein synthesis to sugar chain qualification within one system using this extract.

[0016]

[Means for Solving the Problem] As a result of invention in this application persons' considering preparation of a cell extract as above-mentioned, preparation of the following cell extracts was enabled. Preparation of the cell extract of this invention makes a cell crush with a means [****] to change the pressure of the environment which surround a cell to reduced pressure from pressurization, and also makes sugar chain qualification activity specifically collect further the protein synthesis activity which a cell has at least in a cell extract.

[0017] That is, the cell-free extract of this invention crushes a cell, is prepared, is a cell-free extract which has the activity which makes protein compound from a mold nucleic acid, makes said cell in the ambient atmosphere of inert gas, and under pressurization decompress, and is characterized by crushing said cell.

[0018] According to the above-mentioned invention, a cell is not mashed like a homogenizer like before, but a cell is crushed or burst by pressure variation, and it is prepared. Thus, by making a cell crush by pressure variation, as compared with the crushing approach like the conventional homogenizer, it becomes possible to make a cell crush on conditions [****], and it becomes possible to reduce the effect of the organ on intracellular etc.

[0019] Moreover, the cell-free extract of this invention crushes the cell which has protein-synthesis activity and the sugar-chain qualification activity which adds a sugar chain to the compounded protein, is prepared, is a cell-free extract which can compound glycoprotein from a mold nucleic acid, makes said cell in the ambient atmosphere of inert gas, and under pressurization decompress so that the protein-synthesis activity and the sugar qualification activity which said cell has may be saved, and is characterized by to be crushed said cell.

[0020] Thus, according to this invention, the cell extract holding both activity is prepared by making the cell which has protein synthesis (translation) activity and sugar chain qualification activity crush by pressure variation which does not destroy both [these] activity. It can make as a system having the acellular translation system currently prepared independently thereby conventionally and a sugar chain qualification system, and it becomes possible by using this system to perform protein synthesis and sugar chain qualification by one cell extract.

[0021] Furthermore, this invention offers the constituent for acellular glycoprotein composition. This constituent for acellular glycoprotein composition adds the cell extract which has the above-mentioned sugar chain qualification activity to the cell extract which has protein synthesis activity, and is constituted. Thus, it can supplement with sugar chain qualification activity, and the constituent which also has sugar chain qualification activity with protein synthesis activity can be made to constitute by adding to the cell extract which has only protein synthesis activity for the cell extract which has sugar chain qualification activity by itself.

[0022] Moreover, this invention offers a glycoprotein composition system. A mRNA composition means to make DNA to mRNA which carried out the code of the protein with which sugar chain qualification of this glycoprotein composition system may be carried out imprint. The glycoprotein composition means which can compound glycoprotein from mRNA compounded by the mRNA. composition means with the cell-free extract or constituent which has the above-mentioned protein synthesis activity and sugar chain activity, It is characterized by compounding the glycoprotein by which sugar chain qualification was carried out with said glycoprotein composition means based on mRNA imprinted from DNA by the preparation and said mRNA composition means.

[0023] If even template DNA is prepared according to this system, it will become possible from this template DNA to make glycoprotein compound simple through mRNA.

[0024] Moreover, the above-mentioned glycoprotein composition system can be made to be able to insert in a promoter's lower stream of a river DNA which carried out the code of said protein by which sugar chain qualification may be carried out further, and can be equipped with the expression vector which makes mRNA discover from said DNA. Thus, it becomes possible by having an expression vector further to make glycoprotein compound simple by starting the interested gene for example, in a genome, and connecting with this expression vector.

[0025] It is characterized by equipping the above-mentioned expression vector with the untranslation region array which is an array in which an untranslation region is made to add to mRNA compounded by the manifestation from said promoter, and is the proteinic gene origin by which sugar chain qualification may be carried out by intracellular [which was used for preparation of said cell-free extract]. Thus, by having the untranslation region of the gene which generates

glycoprotein by intracellular [concerned], it becomes possible to raise the effectiveness of the sugar chain qualification to synthetic protein.

[0026] Moreover, if the cell-free extract by above-mentioned this invention, a constituent, and a glycoprotein composition system are used, since glycoprotein is generable simple, it becomes possible to perform intracellular functional analysis using glycoprotein easily.

[0027] Furthermore, this invention offers a cell-free extract manufacturing installation. This cell-free extract manufacturing installation crushes the cell which has protein synthesis activity. The container which is equipment for manufacturing the cell-free extract which can compound protein from a mold nucleic acid, and holds said cell, It is characterized by having the gas supply section filled up with inert gas in said container, and the pressure control section made to decompress after pressurizing the pressure in said container so that the cell in said container can be crushed, where the protein synthesis activity which said cell has is held.

[0028] Moreover, the above-mentioned cell-free extract manufacturing installation is characterized by to change the pressure in said container from a pressurization condition to a reduced pressure condition so that it may have the sugar chain qualification activity which makes a sugar chain add to the protein with which said cell was compounded further and the cell in said container may be crushed, where the protein synthesis activity and sugar chain qualification activity which said cell has [said pressure control section] are held.

[0029] If these cell-free extract manufacturing installation is used, it will become possible to manufacture the cell extract or the cell extract which also has sugar chain qualification activity further which has protein synthesis activity simple.

[0030]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, it explains using the suitable operation gestalt of this invention.

[0031] By decompressing the pressure of the cell in the ambient atmosphere of inert gas, and under pressurization, [preparation of cell-free extract] cell-free extract crushes a cell, and is prepared.

[0032] If it is the cell which has the translational activity which makes protein compound from a mold nucleic acid, and the sugar chain qualification activity which performs sugar chain qualification after a translation, what kind of cell is sufficient as the cell which can be used for preparation of the above-mentioned cell-free extract, and it can be widely included from a prokaryotic cell to an eukaryotic cell. For example, cells, such as the mammals, birds, reptiles, an amphibian, fishes, vegetation, and a microorganism, are mentioned. And the cell which can collect translational activity among such broad cells can adopt a mammalian cell, an insect cell, etc. suitably. Moreover, when collecting translational activity and sugar chain qualification activity, an insect cell etc. can be used suitably. In addition, the cell which is organizing or was extracted from the organization is sufficient as these cells, and they may be cultured cells.

[0033] While the above-mentioned cell crushes, it is arranged in the ambient atmosphere of inert gas. This inert gas is used so that the extract after cell crushing may contact air and may not affect translational activity etc. Therefore, if this purpose can be attained, there is no limitation in the class of inert gas, for example, nitrogen gas, argon gas, etc. can be used.

[0034] A cell strain can determine suitably the pressure at the time of the pressurization at the time of crushing the above-mentioned cell. This pressure can determine the translational activity of the extract finally extracted in the periphery of the cell to be used in consideration of the pressure resistance of the factor which participates in the qualification after the reinforcement of the wrap film, a wall, etc., an internal translation, and a translation etc. as an index. For example, in the case of the cell of the insect origin, it can consider as 2 - 14 kgf/cm², and more preferably, it can consider as 5 - 8 kgf/cm², and can consider as 8 kgf/cm² still more preferably. Moreover, in the case of a CHO cell, it is suitable that it is a pressure comparatively higher than an insect cell, and it can specifically consider as 2 - 32 kgf/cm².

[0035] Moreover, each cell strain etc. can also determine pressurization time amount suitably. Translational activity of the extract finally prepared in the periphery of the cell to be used in consideration of the pressure resistance of the factor which participates in the qualification after the reinforcement of the wrap film, a wall, etc., an internal translation, and a translation etc. can be made into an index in this decision. For example, in the case of the cell of the insect origin, it can consider as for 60 - 90 minutes still more preferably for 120 minutes from 30 preferably for 3 - 120 minutes.

[0036] Moreover, that the reduced pressure after pressurization should just decrease a pressure rapidly so that a cell can be crushed, the pressure in the case after reduced pressure can lengthen ordinary pressure extent or a pressure mechanically, and can also make it a pressure still lower than ordinary pressure.

[0037] supply and discharge of gas into the ambient atmosphere in which, as for the pressure variation from the above-mentioned pressurization condition to a reduced pressure condition, the cell was held — or the curtailment of the volume in which a cell is held, and an escape can perform. When based on supply and discharge of the former gas here, the above-mentioned inert gas can be suitably used as this gas.

[0038] Finally, a cell-free extract is prepared by collecting the extracts after cell crushing. It is used mainly in the semantics distinguished from survival intracellular cell sap, and, this cell-free extract, the existence of mixture of the cell residue after the above-mentioned crushing does not ask. Therefore, the cell extract after the above-mentioned crushing can be made into a cell-free extract after centrifugal separation etc. removes the residue of the cell crushed as a condition that residue exists, if needed.

[0039] Moreover, although it has protein synthesis activity depending on independent use of the extract of the specific cell origin, or its sugar chain qualification activity is low, when not demonstrating, it can add the cell-free extract of other cell origins which have sugar chain qualification activity at a suitable rate, and can make it supplement with sugar chain qualification activity, although the thing of the specific cell origin can also be independently used for the cell-free extract prepared here. For example, although it has protein synthesis activity depending on independent use, when not demonstrating sugar chain qualification activity, it can add suitably the cell-free extract which also has the sugar chain qualification activity of the insect cell origin, and can also make it supplement with sugar chain qualification activity like the cell-free extract of the CHO cell origin.

[0040] The mold nucleic acid which serves as a substrate of a line sake in a translation and sugar chain qualification is explained using a [glycoprotein composition system], next the above-mentioned cell-free extract.

[0041] In 1 and expression vector protein synthesis (translation), mRNA is needed as that mold, and DNA is needed for this mRNA generation (imprint) as that mold. Here, the expression vector containing the template DNA used as the foundation of this mRNA composition is explained.

[0042] In order to compound mRNA used as the foundation of protein synthesis, the array of the request which carried out the code of the protein is inserted in an expression vector. Although there is especially no limitation, since the above-mentioned cell-free extract can also perform sugar chain qualification after protein synthesis, the array which carried out the code of the protein by which sugar chain qualification may be carried out as this protein coding sequence can be suitably used for this protein coding sequence.

[0043] In the above-mentioned expression vector, the upstream of the array which carried out the code of the above-mentioned protein is equipped with the promoter who makes an imprint start. As this promoter, although there is especially no limitation, in order to compound mRNA of a single strand, it can use various RNA polymerase promoters suitably. As the example, T7 RNA-polymerase promoter, T3 RNA polymerase, SP6 RNA polymerase, etc. are mentioned.

[0044] Moreover, to an expression vector, to insert the above-mentioned protein coding sequence, the both ends are adjoined, it has 3' untranslated region (UTR) array, and 5' and when these arrays are compounded as mRNA, they are added to the both ends of mRNA as UTR, and control a translation. Since this UTR array functions as a control array in case it makes it translate using a cell-free extract, as for this array, it is desirable to choose according to the cell used for preparation of a cell-free extract, for example, UTR originating in the virus infected with UTR or such a cell of the cell origin concerned, phage, etc. can be used.

[0045] For example, when an insect cell is used for preparation of the above-mentioned cell-free extract, UTR originating in the virus which has infection ability into UTR or the insect cell of the insect cell origin as this UTR, for example, a baculovirus etc., can be used.

[0046] Moreover, to the above-mentioned expression vector, it is desirable to make self-renewal ability hold. Such self-renewal ability can use the self-renewal ability which various plasmids, a viral DNA, etc. have. These can be suitably chosen according to the host for making the manifestation by the host or this vector for making this expression vector amplify perform. For example, when choosing Escherichia coli as a host, a pUC system and a pBR system plasmid can be used as an

expression vector. Moreover, when making a mammalian cell into a host, viral DNAs, such as SV40, etc. can be used suitably. If required, it can also constitute as a shuttle vector which has self-renewal ability in the host from whom even a preparation differs two or more self-renewal ability. [0047] In order to make mRNA compound using 2 and the synthetic above-mentioned expression vector of mRNA, transcription factors, such as RNA polymerase, are needed. The transcription factor which a survival cell holds can be used for such a transcription factor. That is, the above-mentioned expression vector can be introduced into this survival intracellular, and mRNA can be made to compound using an intracellular transcription factor. The target mRNA is prepared when mRNA compounded here carries out separation purification from other intracellular mRNA(s) according to a known approach.

[0048] When an intracellular transcription factor is used as mentioned above, it is necessary to refine the target mRNA from intracellular countless mRNA, but in order to simplify such mRNA purification actuation, this transcription factor can use the extract and in vitro imprint system which have the transcriptional activity extracted from the cell. As an in vitro imprint system, the imprint system of reaction of T7 phage origin, the imprint system of reaction of the Escherichia coli origin, etc. can be illustrated, for example. mRNA composition using this system can be carried out using a commercial kit (Ambion), for example, MEGAscript™, RiboMAX™ (Promega), etc.

[0049] Thus, when mRNA is compounded by in vitro one (imprint process), it becomes possible to perform a series of processes to the protein synthesis (translation) later mentioned from a mRNA composition (imprint) process, and a subsequent sugar chain qualification process in the outside of a cell, i.e., in vitro one.

[0050] 3, a translation of protein, a sugar chain qualification in vitro translation, and a sugar chain qualification reaction can be performed by adding Above mRNA to the cell-free extract which has sugar chain qualification activity in the above-mentioned protein synthesis activity list fundamentally. That is, since it has the translational activity which carries out protein synthesis, and the sugar chain qualification activity after this translation, protein is compounded by addition of mRNA to the above-mentioned acellular extraction system from the mRNA concerned, after that, to the above-mentioned acellular extraction system, sugar chain qualification to this protein is carried out, and glycoprotein is compounded.

[0051] Moreover, in compounding glycoprotein in the above, magnesium acetate, potassium acetate, spermidine, GTP and ATP, creatine kinase, a buffer, etc. can be added to a cell extract, and a cell extract can be prepared. As an example, it sets to the cell extract of an insect cell, and they are 10.6mM(s) about the last concentration. HEPES-KOH (pH7.95), 1.3mM magnesium acetate, 100mM Potassium acetate, 2.5mM DTT, 0.25mM spermidine, 444microg [ml] creatine kinase, a 8.0mM phosphoric-acid creatine, 1.2mM ATP, 0.25mM It can prepare to GTP and a translation reaction can be presented. Moreover, it is suitable for a cell extract to add amino acid mixed liquor. This mixed liquor can be added so that final concentration may become about [25micro] M.

[0052] Moreover, although it is necessary in protein synthesis to add mRNA to a cell extract, this addition can be added so that it can consider as the same addition as the conventional in vitro translation system, for example, may become 200microg [ml] final concentration to a cell extract. The protein compounded by such approach can use this synthetic protein (or glycoprotein) for the various purposes, after being isolated from a cell extract if needed.

[0053] From preparation of the [translation equipment] above-mentioned cell extract to proteinic (**** white matter) composition may be automated. Such equipment can be constituted as follows.

[0054] The extract preparation section 12 for translation equipment 10 to prepare a cell-free extract from a cell and the translation section 14 in which protein synthesis is made to perform using this extract are formed.

[0055] A cell is held in the interior, a cell is crushed in this interior, and, as for this extract preparation section 12, an extract is prepared. Crushing of this cell is performed by the pressure variation inside the extract preparation section 12. In order to perform this pressure variation, inert gas is held in the extract preparation section 12, and the inert gas feed zone 16 for supplying inert gas to said extract preparation section is formed in it. That is, by sending inert gas into the extract preparation section 12, this inert gas feed zone 16 raises the pressure inside the preparation section 12, and applies a pressure to the held cell. Moreover, the inert gas supplied from this inert gas feed zone 16 prevents that the extract after cell crushing contacts air (oxygen), and prevents

the various activity falls in an extract.

[0056] Moreover, discharge the sent-in inert gas in the above-mentioned extract preparation section 12, it is made to decompress the pressure inside the preparation section 12, and the exhaust port 18 for making a cell crush (burst) is formed in it.

[0057] In order to control pressure variation by the feed of the inert gas to these extract preparation section 12, and its discharge, the extract preparation section 12 is equipped with a control section 20. This control section 20 enables control according to the reinforcement of the film which covers a cell, and a wall etc., and makes protein synthesis activity and sugar chain qualification activity collect in the cell extract after cell crushing.

[0058] On the other hand, the translation section 14 is connected to said extract preparation section 12 so that supply of the extract prepared in the above-mentioned extract preparation section may be attained. The interior of this translation section 14 is equipped with a reaction container although not shown in drawing 1, and said extract is poured into this reaction container. Moreover, this translation section 14 is equipped with the sample impregnation section, and mRNA which serves as a substrate of protein synthesis by this sample impregnation section is poured into a reaction container.

[0059] According to the above-mentioned translation equipment 10, by supplying a cell to the extract preparation section 12, a cell is crushed in the extract preparation section 12, and a cell extract is prepared. And the cell extract prepared here is supplied in a reaction container in the translation section 14, mRNA is added by this, and composition of glycoprotein is performed.

[0060] In addition, as long as it is required, it may have the imprint section which makes mRNA generate from an expression vector, and mRNA supplied to translation equipment in this imprint section may be made to generate in the above-mentioned translation equipment. Thus, when it has the imprint section, it becomes possible from an expression vector to make a series of processes to composition of glycoprotein automate through mRNA.

[0061]

[Example] Hereafter, although an example explains this invention concretely, this invention is not limited to these examples.

[0062] [Example 1] In vitro composition of this glycoprotein was tried using GP120 of HIV (human immunodeficiency virus) as protein with which it is known [which is done for preparation sugar chain qualification] about the expression vector. The expression vector which makes this gp120mRNA discover was built in composition of this glycoprotein as follows. In addition, the configuration of gp120mRNA which equipped drawing 2 with the PORIHE drine compounds UTR typically discovered by drawing 3 from ***** KUTA in the construction approach of an expression vector was shown. Moreover, it is this base sequence of PORIHE drine compounds 5'-UTR to the array number 1 3' - The base sequence of UTR is shown in the array number 2 (Robert, D. et al., Virology 185, and 229-241 (1991)).

[0063] Point mutation was inserted for pVL1393-gp120 plasmid by PCR, and the recognition site of EcoRI and Sall was made to form in the both ends of gp120 first in drawing 2. EcoRI and a Sall restriction enzyme cut the plasmid after this variation insertion, and the gp120' fragment which both ends lack a little was isolated. On the other hand, EcoRI and a Sall restriction enzyme cut similarly the plasmid pUC18 used as the frame of an expression vector, it inserted the above-mentioned gp120' fragment there, and set it to pUC 18-1.

[0064] Next, using two primers which have XhoI or Sall at the end, the remaining array of an edge and 3'3' UTR array of gp120 were made to amplify from pVL1393-gp120 plasmid by PCR, this magnification fragment was inserted in the Sall part of pUC 18-1, and this was set to pUC 18-2.

[0065] Composition generated the remaining array of an edge and 5'5' UTR array of gp120, and they added T7 RNA-polymerase promoter array number 3 to the upstream of 5'UTR on the occasion of this composition. Furthermore, an EcoRI part is inserted in PCR to those both ends, and this synthetic fragment made this fragment insert in the EcoRI part of pUC 18-2. pUC18-gp120 plasmid by which gp120 manifestation cassette including a UTR array was inserted by this in the lower stream of a river of T7 RNA-polymerase promoter array was generated.

[0066] This pUC18-gp120 plasmid was made to imprint in in vitro one using MEGAscript™ (Ambion), and gp120mRNA shown in drawing 3 was prepared. Hereafter, various examination in composition of glycoprotein was performed by using this gp120mRNA as mold.

[0067] (1) It carried out to preparation of the effect cell extract of the number of cells using insect cell Sf21 cell (J.L.Vaughn, R.H.Goodwin, G.L.Tompkins, and P.McCawley, In Vitro, 13, and 213-217

(1977)). The cell suspension of the cell concentration from which Sf21 cell differs was put in, respectively in the mini bomb (MINI-BOMB CELL DISRUPTION CHAMBER (product made from KONTES)), and it processed for 30 minutes by nitrogen gas pressure 8 kgf/cm². According to centrifugal separation (L7Ultracentrifuge 55 made from BECKMAN mold, rotor SW40Ti Rota, 14000rpmx15min), the cell extract was obtained for each cell sap after this processing.

[0068] Translation ability was investigated using the cell extract prepared above. In order to analyze translation ability, the above-mentioned gp120mRNA was added to the cell extract so that it might become the 200microg [/ml] last concentration, and the translation reaction was performed. The quantum of the protein after a reaction was carried out by two approaches. One is the approach avidin detects the amount of incorporation to the translation product of the biotin indicator lysine tRNA. The approach of detecting a translation product with the western blotting method which used the antibody of GP 120, and carrying out the quantum of the detected product by Densitrometer (FastScan, product made from Molecular Dynamics) was used for other approaches. These assays estimated translation ability. The result is shown in Table 1.

[0069]

[Table 1]

細胞数の影響

	細胞密度 (10 ⁸ cells/ml)			
	1.5	1.0	0.5	0.25
翻訳能 (%)	91	100	44	1.7

As shown in Table 1, in order that a cell extract might maintain translation ability, the desirable numbers of cells were 0.25 to 2.5x10⁸ range /ml, and its number of 1.0x10⁸ cells /ml was especially the optimal.

[0070] (2) The effect which exerts the nitrogen gas pressure in the effect mini bomb of a nitrogen gas pressure on translation ability in the range of 2 – 14 kgf/cm² was considered like the above. Making the number of cells into 1.0x10⁸ suitable cell numbers /ml in the above, nitrogen gassing time amount was set up in 30 minutes, and crushed the cell. To the obtained cell extract, gp120mRNA was added so that it might become the 200microg [/ml] last concentration, and the translation reaction was performed. Translation ability was compared from the amount of protein synthesis under each gas pressure conditions. The result is shown in Table 2.

[0071]

[Table 2]

窒素ガス圧の影響

	窒素ガス圧 (kg/cm ²)		
	5	8	14
翻訳能 (%)	99	100	64

As shown in Table 2, a nitrogen gas pressure can be made into the range of 2 – 14 kgf/cm², and can be preferably made into the range of 5 – 8 kgf/cm². The nitrogen gas pressure was 8 kgf/cm² the optimal.

[0072] Moreover, the fractionation pattern at the time of carrying out fractionation of the protein which compounded protein and was compounded from gp120mRNA here to drawing 4 using Sf cell extract prepared on the pressurization conditions of 5, 8, and 14 kgf/cm² is shown. As shown in the lanes 2, 4, and 6 of drawing 4, in the cell extract prepared according to the pressurization conditions of 5 – 14 kgf/cm², it was shown that glycoprotein (drawing 4 is shown as an arrow head 1) is specifically compounded from mRNA, and good glycoprotein composition was especially detected in the cell extract by the pressurization conditions of 8 and 14 kgf/cm².

[0073] (3) The number of effect cells of nitrogen gas pressurization time amount was made in 1.0x10⁸ pieces [ml] /, the nitrogen gas pressure was made into 8 kgf/cm², and the nitrogen gas pressurization time amount for preparing a cell extract was examined.

[0074]

[Table 3]

窒素ガスによる加圧時間の影響

	加圧時間 (分)							
	3	5	10	15	30	60	90	120
翻訳能 (%)	25	40	56	63	76	100	100	46

As shown in Table 3, the pressurization time amount for 30 – 60 minutes was [that what is necessary is just the pressurization time amount more than for 3 minutes] especially suitable. [0075] (4) The rate which makes cell crushing liquid blow off from the inside of the effect mini bomb of the spray velocity was examined in the range of 15 – 200 ml/sec. The spray velocity did not affect translation ability.

[0076] [Example 3] The mRNA addition to the cell extract in the case of the optimum-ized translation reaction of the examination (1) mRNA concentration of a translation reaction condition was examined. To the above-mentioned Sf cell extract, gp120mRNA was added, respectively so that it might become 2 double concentration one by one from 3.125microg/ml to 400microg/ml, and translation ability and sugar chain qualification ability were measured. The result is shown in drawing 5. In addition, in drawing 5, GP120 by which GP120 to which the sugar chain does not attach the round mark is not added in the rhombus mark to the sugar chain is shown.

[0077] As shown in drawing 5, it was shown that generation of GP120 (sugar chain un-adding) can use translation ability efficiently highly in 200microg/ml. On the other hand, when glycoprotein was 50micro more than g/ml, it showed the high, almost fixed value.

[0078] (2) The temperature conditions of reaction temperature and the effect translation reaction time of reaction time were examined. To the cell extract, gp120mRNA was added so that it might become the 200microg [/ml] last concentration, under the temperature of 15 degrees C – 45 degrees C, for 30 and 60 or 90 minutes, the reaction was made to perform and the amount of generation of the translation product in that case was measured. In addition, it considered as 1.0×10^8 cell numbers/ml here, and nitrogen gassing time amount was set up in 30 minutes, and used the cell extract which crushed the cell and was prepared.

[0079] What graph-ized the amount of phase pair creation is shown in drawing 6. As shown in drawing 6, in the reaction temperature of 25 degrees C, it was guessed that a translation and sugar chain qualification activity are shown, and the peak of activity exists around for reaction-time 60 minutes in sugar chain qualification activity especially, and a peak exists in the hit for 30 to 60 minutes in translational activity.

[0080] On the other hand, in 37 degrees C, as compared with 25 degrees C, a translation and sugar chain qualification activity fell to one half extent, and both activity fell remarkably at 45 degrees C. Moreover, at 15 degrees C, although both activity was low, about glycoprotein, the pattern with which the amount of generation rises in proportion to time amount was shown.

[0081] In addition, the graph which compared the yield of GP120 by reaction temperature and reaction time similarly is shown in drawing 7 using the **** cell extract which performed cell crushing and prepared the cell of **** on the same conditions as the above-mentioned Sf cell. Also in ****, a good translation and sugar chain qualification activity were shown by the reaction temperature of 25 degrees C.

[0082] (2) The effect of the translation ability on [at the time of adding various reagents] was investigated to the effect cell extract of addition, such as a reagent. Here, about magnesium acetate, potassium acetate, spermidine, GTP and ATP, and creatine kinase, it added by the concentration of the range respectively fixed to a cell extract, the quantum of the amount of generation of the protein from gp120mRNA or glycoprotein was carried out relatively, and translation ability and sugar chain qualification ability were examined.

[0083] The result of having examined magnesium acetate concentration to drawing 8 is shown. In addition, in drawing 8, GP120 by which GP120 to which the sugar chain does not attach the round mark was added in the rhombus mark to the sugar chain is shown.

[0084] As shown in drawing 8, about magnesium acetate, good translational activity was shown in 1.5mM, and the good result was shown [activity / sugar chain qualification] in 2mM.

[0085] The result of having examined potassium acetate concentration to drawing 9 is shown. About potassium acetate, it was shown in 100mM that translational activity and sugar chain qualification activity are high. In addition, in drawing 9, GP120 by which GP120 to which the sugar chain does not attach the round mark was added in the rhombus mark to the sugar chain is shown

like drawing 8 .

[0086] The result of having examined spermidine concentration is shown in drawing 10 . About spermidine, it was shown in 0.25mM that the amount of protein generation (**** addition) is the highest, and 0.25mM is suitable. In addition, in drawing 10 (also setting to drawing 11 , and 12 and 13 hereafter the same), GP120 by which GP120 to which the sugar chain does not attach the continuous line was added into the dotted line to the sugar chain is shown.

[0087] The result of having examined GTP concentration is shown in drawing 11 . About GTP, in 0.25mM, the amount of protein generation (**** addition) was the highest, and it was shown that a translation is efficiently performed in this density range. On the other hand, it was shown that generation of glycoprotein is not greatly influenced by GTP concentration.

[0088] The result of having examined ATP concentration is shown in drawing 12 . About ATP, in 1-1.5mM, the amount of protein generation (**** addition) was the highest, and it was shown that a translation is efficiently performed in this density range. On the other hand, it was shown that generation of glycoprotein is not greatly influenced by ATP concentration although the value high a little is shown in 0.5.

[0089] The result of having examined creatine kinase concentration is shown in drawing 13 (a) and (b). As shown in drawing 13 (a) and (b), the result in 400microg/ml with the best translational activity was shown through two experiments. On the other hand, about sugar chain qualification activity, the good result was shown more than in 400microg/ml.

[0090] These results were synthesized, the cell extract was prepared to the following presentation in the example shown below, and the translation reaction was performed at 25 degrees C.

[0091]

An insect cell extract A260=30.4 HEPES-KOH (pH7.95) Final concentration 10.6mM magnesium acetate Final concentration 1.3mM potassium acetate Final concentration 100mM DTT Final concentration 2.5mM spermidine Final concentration 0.25mM creatine kinase A 444microg [/ml] final concentration phosphoric-acid creatine Final concentration 8.0mM ATP Final concentration 1.2mM GTP Final concentration 0.25mM amino acid mixture Final concentration MmRNA of 25micro 200microg [/ml] final concentration [an example 4] The translation product GP120 compounded by Western blotting using the identification HIV patient antiserum of the translation product using an insect cell extract using the above-mentioned insect cell extract was analyzed. An analysis result is shown in drawing 14 and drawing 15 .

[0092] As shown in drawing 14 , GP120 was detected in the location which is equivalent to 90kDa (s) and 56kDa(s) on SDS-PAGE (lanes 2 and 3). On the other hand, GR120 discovered by Sf21 cell by baculovirus-insect cell lineage is glycoprotein, and is detected as a band very strong against the location of 90kDa (lanes 5 and 6). This suggests possibility that the sugar chain is added to the translation product compounded using Sf cell extract.

[0093] On the other hand, strongly, the band was detected (drawing 15 R>5, lanes 4 and 6), and the band which is equivalent to the location of 90kDa(s) like the translation product compounded using the insect cell extract (lane 2) was not detected in the location of 56kDa(s) by the translation product obtained in the cell extract of the control prepared from rabbit reticulocyte and a wheat germ. Possibility that posttranslational modification, such as sugar chain addition, was performed only in GP120 by which this was compounded by the insect cell extract was suggested strongly.

[0094] [Example 5] In order that the translation product GP120 compounded by the desugar chain example 4 of a translation reaction product by the translation reaction using Sf21 cell extract might check that it is glycoprotein by which sugar chain qualification was carried out, sucroclastic enzyme was used and the translation product GP120 was processed. Here, N type sugar chain dialytic ferments, such as N-glycosidaseF, endoglycosidaseF, or endoglycosidaseH, were used as sucroclastic enzyme. The result of a decomposition reaction is shown in drawing 16 .

[0095] As shown in drawing 16, as a result of processing GP120 with the above-mentioned N type sucroclastic enzyme, the band of 90kDa(s) which exist in a non-processed fraction disappeared, it changed to it, and the band of new protein was detected with the non-processed sample in the location (location shown by the arrow head) which is not accepted. This showed that it was the band shift produced with the desugar chain, and suggested strongly that the N type sugar chain was added to the translation reaction product GP120. In addition, although similarly processed by O-glycosidase, addition of O mold sugar chain was not accepted (not shown).

[0096] Moreover, it examined by other approaches whether a translation product would have a

sugar chain. The lectin-sepharose column was presented with the GP120 above-mentioned protein, elution was carried out by methyl- α -D-MANNO pyranoside, and fractionation was performed. And Western blotting was performed for the bypassing fraction obtained here and the elution fraction by methyl- α -D-MANNO pyranoside using HIV patient antiserum. Consequently, the band of gp120 was detected in the location which is equivalent only to the elution fraction by methyl- α -D-MANNO pyranoside at the above-mentioned 90kDa (not shown). Also from this, the translation product GP120 suggested strongly that it was glycoprotein which has a sugar chain.

[0097] [Example 6] It investigated whether translation and sugar chain qualification would be performed by preparing different mRNA from the above-mentioned example about the coding sequence which carried out the code of the protein with which the glycoprotein composition analysis UTR using various mRNA(s), a signal sequence, etc. may be control-arranged and sugar chain embellished. In addition, the thing of the PORIHE drine compounds origin of a baculovirus and the bovine growth hormone (BGH) origin was used for UTR used here. Moreover, as a signal sequence, the interleukin 6 (IL6) origin (array number 5) and the fowl lysozyme (cL) origin (array number 4) were used. Moreover, the interleukin 6 (IL6) coding sequence was used for the coding sequence in common. These were built as a manifestation plasmid using pUC18 like the example 1, generated mRNA using this, and investigated the following translations and sugar chain qualification activity. The list of the result is shown in Table 4.

[0098]

[Table 4]

Table 4

					翻訳／糖付加	昆虫	紫蚕	ウサギ	小麦胚芽	
1	BMV	タンパク 2a	翻訳	+	+	++	+	+		
2		タンパク 2a	翻訳	±	±	++	++	++		
3		外被タンパク	翻訳	+	+	±	++	++		
4	SF162	gp120	翻訳 糖付加	+	+	+	+	+		
発現系	5' -UTR	シグナル	コードタンパク	3' -UTR						
5	ppILIL6p	ホリヘトリ	IL6	IL6	ホリヘトリ	翻訳	-	ND	ND	
6	ppCIL6p	ホリヘトリ	cL ^{a)}	IL6	ホリヘトリ	翻訳 糖鎖付加	+	+	ND ND	
7	pp(-)IL6p	ホリヘトリ	なし	IL6	ホリヘトリ	翻訳	+	+	ND	
8	pBILIL6B	BGH ^{b)}	IL6	IL6	BGH	翻訳	-	ND	ND	
9	pBCIL6B	BGH	cL	IL6	BGH	翻訳	-	ND	± ND	
10	pB(-)IL6B	BGH	なし	IL6	BGH	翻訳	-	ND	± ND	
11	ppCIL6B	ホリヘトリ	cL	IL6	BGH	翻訳 糖鎖付加	+	ND	+	ND ND
12	pBCIL6p	BGH	cL	IL6	ホリヘトリ	翻訳	-	ND	-	ND

a) cL : chicken lysozyme

b) BGH : bovine growth hormone

c) ND : not determined

In the analysis using mRNA of SF162gp120 shown in the example 1, although a translation and sugar chain qualification activity were checked in the extract of an insect Sf cell and the **** origin, although translational activity was accepted, in the rabbit reticulocyte of control, and the cell extract of the wheat germ origin, sugar chain qualification activity was not detected like the insect cell.

[0099] Moreover, from the analysis using mRNA from which a control array differs variously, when the array of cL origin was used for 5'UTR for 5'UTR of the PORIHE drine compounds origin as a signal sequence in (the 5-12th columns) and an insect cell extract, it was shown that translation and sugar chain qualification are performed (the 6th and 11 column). Moreover, it did not ask whether 3'UTR is the PORIHE drine compounds origin or it was the bovine growth hormone origin, but sugar chain qualification was performed.

[0100] On the other hand, when the thing of the BGH origin was used for 5'UTR in an insect cell extract, and when IL6 signal was used as a signal sequence, only the translation was performed and sugar chain qualification was not performed. From this, it was shown that 5'UTR and a signal sequence are important for activation of sugar chain qualification.

[0101] In addition, in the rabbit reticulocyte of control, and the cell extract of the wheat germ

origin, sugar chain qualification was not observed at all by used mRNA.

[0102] [Example 7] In the cell extract of the examination mammalian cell using a CHO cell, it examined whether it would have a translation and sugar chain qualification activity like the above-mentioned insect cell. Here, the CHO cell extract was prepared by the same approach as the preparation conditions of the cell extract of the above-mentioned insect cell, using a CHO cell as a mammalian cell. Moreover, three sorts of mRNA(s) were prepared in analyses, such as translation ability of the cell extract of this CHO cell. These mRNA(s) are UTR of expression vector pRc/CMV for the second mRNA equipped with the first mRNA which has (1) gp120 (HIV-1SF162 origin) coding sequence, the PORIHE drine compounds UTR, and gp120 signal sequence, (2) IL6 coding sequence, the PORIHE drine compounds UTR, and cL signal sequence, (3) IL6 coding sequence, and mammals, and the third mRNA equipped with the signal sequence of IL6 as they are shown in the following table 5.

[0103] The translational activity of a CHO cell extract and sugar chain qualification activity were investigated using these three sorts of mRNA(s). The result is shown in Table 5. In addition, the result in the cell extract of an insect cell (Sf cell) by which a translation and sugar chain qualification activity were checked is similarly shown as electropositive control.

[0104]

[Table 5]

細胞抽出液	鋳 型	鋳型タイプ	UTR	シグナル配列	翻訳	糖鎖付加
昆虫細胞	HIV-1 SF162 のgp120	バキュロ ウイルス (昆虫)	ポリヘドリン	HIV-1 SF162 のgp120	+++	+++
	ヒト型イン ターロイキン 6	CHO細胞 (哺乳類)	ポリヘドリン	ニワトリリゾ チーム	+++	+++
			哺乳類用発現 ベクター pRc/CMVの UTR	ヒト型インター ロイキン6	++	++
CHO細胞	HIV-1 SF162 のgp120	バキュロ ウイルス (昆虫)	ポリヘドリン	HIV-1 SF162 のgp120	++	-
	ヒト型イン ターロイキン 6	CHO細胞 (哺乳類)	ポリヘドリン	ニワトリリゾ チーム	++	-
			哺乳類用発現 ベクター pRc/CMVの UTR	ヒト型インター ロイキン6	+++	-

+ : 合成した - : 合成しない

Although translational activity was detected also in which mRNA in the CHO cell extract as shown in Table 5, sugar chain qualification activity was not able to be checked. Thus, by the cell extract of a CHO cell, although sugar chain qualification activity was not able to be checked, on the other hand, it was shown that the cell crushing approach by change of the above-mentioned gas pressure can collect from a mammalian cell at least the cell extracts which have translational activity.

[0105] Moreover, when translation ability was compared and UTR of pRc/CMV was used, it was shown that translation ability is going up. It was shown that it is important for improvement in translation ability to make the class of cell which prepared the cell, and the cell strain in which UTR originates correspond as for this.

[0106] On the other hand, in the insect cell extract used as electropositive control, translational activity and sugar chain qualification activity were checked also in which mRNA. When the PORIHE drine compounds UTR was used especially, raising translational activity and sugar chain qualification activity was shown. From this, it has infection ability into the cell which prepared the

cell extract, and it was shown that UTR of the living thing origin which can be grown can be suitably used as a control array for making the translation and sugar chain qualification which used the cell extract perform.

[0107] [Example 8] Although translational activity was detected, by the CHO cell extract, it was undetectable about sugar chain qualification activity, as [of a CHO cell extract and an insect cell (Sf cell) extract] mixed presentation liquid **** was carried out. Since it supplemented with this sugar chain qualification activity, the presentation liquid which mixed the CHO cell extract and the insect cell extract at a various mixed rate was prepared, and this presentation liquid examined translational activity and sugar chain qualification activity.

[0108] Specifically, mRNA used IL6mRNA (mRNA from ppIL6 in an example 6, ppIL6B, or ppCLIL6B) equipped with the signal sequence which originates [IL6] or originates [fowl lysozyme (cL)] in the above-mentioned examination. These mRNA(s) were added in each presentation liquid, fractionation of a part of this presentation liquid was carried out by electrophoresis, and Western BUOTINGU using anti-IL6 antibody compared identification of IL6 protein, and the amount of generation of **** after fractionation. The result of Western blotting is shown in drawing 17, and the value which quantified band strength with the densitometer is shown in Table 6.

[0109]

[Table 6]

A) IL6 本来のシグナル配列使用

CHO細胞抽出液	10	9.9	9	5	0
昆虫細胞抽出液	0	0.1	1	5	10
pre-IL6	66	65	57	85	100
糖鎖付加 IL6	0	0	4	43	95
シグナル切除 された IL6	0	0	3	6	33

B) IL6 のシグナル配列をニトリリゾチームのシグナル配列で置換した

CHO細胞抽出液	10	9.9	9	1	0
昆虫細胞抽出液	0	0.1	1	9	10
pre-IL6	26	29	23	31	48
糖鎖付加 IL6	0	2	11	61	100
シグナル切除 された IL6	0	0	2	13	32

Although IL6 protein was detected with CHO-insect (9.9:0.1) presentation liquid as shown in drawing 17 and Table 6, IL6 protein by which sugar chain qualification was carried out was not detected, but not being supplemented with sugar chain qualification activity was shown.

[0110] On the other hand, with CHO-insect (9:1) presentation liquid and CHO-insect (5:5) presentation liquid, the band was detected in the location corresponding to IL6 protein band with which the sugar chain which is detected in the insect cell extract independent case of control was added, and it was shown that sugar chain qualification is performed.

[0111] As mentioned above, even if it is the cell extract which has only translational activity, it becomes possible to supplement with sugar chain qualification activity by mixing the cell extract which has other sugar chain qualification ability. Although this result runs short of one which bears the sugar chain qualification activity which a cell originally has in this cell extract although the cell extract of a CHO cell is prepared on conditions [****] by change of gas pressure of factors and sugar chain qualification activity is not done so, this factor is compensated by the insect cell extract and possibility of saying that it is supplemented with sugar chain qualification activity is suggested.

[0112] [Example 9] It was shown to the translation and the sugar chain qualification pan by the presentation liquid containing the extract of an insect cell and this which showed the example

which carried out application **** that processing can also be performed by in vitro one. Moreover, it became clear also about the control array which may raise the effectiveness of this sugar chain qualification. By package-izing the expression vector equipped with such a cell extract and the control array, an in vitro glycoprotein composition kit can be constituted and it becomes possible to make glycoprotein and the protein by which processing was carried out compound by in vitro one simple.

[0113] Moreover, with the above-mentioned CHO-insect presentation liquid, since processing was also made to perform, it is expected that this presentation liquid will serve also as a model system for analyzing processing of the protein after a translation. That is, it was suggested by performing cell crushing under the mild conditions using inert gas that cell-free extracts were collected where the membrane which participates in sugar chain qualification etc. is saved. Therefore, this cell extract can serve also as a model system at the time of analyzing what processing etc. is carried out after it being not only useful, but [in case glycoprotein etc. is compounded,] the protein. (or precursor) compounded by the translation translating.

[0114]

[Layout Table]

array number: — die-length [of one array]: — mold [of 52 arrays]: — number [of nucleic-acid chains]: — double strand topology: — class [of straight chain-like array]: — the genomic DNA origin living thing name: — the description of a baculovirus array notation: which shows the description — 5'UTR array GGGAGTATTT TACTGTTTTC GTAACAGTTT TGTAATAAAA AAACCTATAA AT 52 array number: — die-length [of two arrays]: — mold [of 379 arrays]: — number [of nucleic-acid chains]: — double strand topology: — class [of straight chain-like array]: — the genomic DNA origin living thing name: — the description of a baculovirus array The description The shown notation : The 3'UTR array AACACGATAC ATTGTTATTA GTACATTTAT TAAGCGCTAG ATTCTGTGCG TTGTTGATTT 60ACAGACAATT GTTGTACGTA TTTTAATAAT TCATTAAATT TATAATCTTT AGGGTGGTAT 120GTTAGAGCGA AAATCAAATG ATTTTCAGCG TCTTTATATC TGAATTTAAA TATTAAATCC 180TCAATAGATT TGTAATAATAG GTTTCGATTA GTTTCAAACA AGGGTTGTTT TTCCGAACCG 240ATGGCTGGAC TATCTAATGG ATTTTCGCTC AACGCCACAA AACTTGCCAA ATCTTGTAGC 300AGCAATCTAG CTTTGTGCGAT ATTCGTTTGT GTTTTGT TTTT GTAATAAAGG TTCGACGTCG 360TTCAAATAT TATGCTGCA 379 array number : The die length of 3 arrays : mold [of 21 arrays]: — number [of nucleic-acid chains]: — double strand topology: — nucleic acid besides class: of a straight chain-like array Synthetic DNA array TAATACGACT CACTATAGGG A 21 array number: — die-length [of four arrays]: — mold [of 54 arrays]: — number [of nucleic-acid chains]: — double strand topology: — a nucleic acid besides class: of a straight chain-like array — The synthetic DNA array ATG AGG TCT TTG CTA ATC TTG GTG CTT TGC TTC CTG CCC CTG GCT GCT CTG 51 Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu ValLeu Cys Phe LeuPro Leu Ala Ala Leu 5 10 15GGG 54Gly 18 array number: — die-length [of five arrays]: — mold [of 84 arrays]: — number [of nucleic-acid chains]: — double strand topology: — a nucleic acid besides class: of a straight chain-like array — The synthetic DNA array ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GCC TTC GGT CCA GTT GCC TTC TCC CTG GGG 51 Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro ValAla Phe Ser Leu Gly5 1015 CTG CTC CTG GTG TTG CCT GCT GCC TTC CCT GCC 84 Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala AlaPhe Pro Ala 20 25 [0115]

[Effect of the Invention] As above, preparation of a new cell extract was offered by this invention, and it became possible to collect the cell-free extracts which have a translation and sugar qualification ability from a cell by this simple. Moreover, it becomes possible by using the cell-free extract of this invention to add the sugar chain of the request which exists in living world to for example, recombination object protein.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the block diagram of the translation equipment in this operation gestalt.

[Drawing 2] It is drawing showing the construction approach of the mRNA expression vector in an example 1.

[Drawing 3] It is the block diagram of mRNA discovered by the expression vector in an example 1.

[Drawing 4] It is drawing about the result of having examined the gas pressure conditions at the time of cell extract preparation in an example 4.

[Drawing 5] It is drawing showing the result of having examined the mRNA addition in an example 4.

[Drawing 6] It is drawing showing the result of having examined the suitable translation reaction time in an example 4.

[Drawing 7] It is drawing showing the result of having examined the suitable translation reaction temperature in an example 4.

[Drawing 8] It is drawing showing the result of having examined the magnesium acetate concentration in an example 4.

[Drawing 9] It is drawing showing the result of having examined the potassium acetate concentration in an example 4.

[Drawing 10] It is drawing showing the result of having examined the spermidine concentration in an example 4.

[Drawing 11] It is drawing showing the result of having examined the GTP concentration in an example 4.

[Drawing 12] It is drawing showing the result of having examined the ATP concentration in an example 4.

[Drawing 13] It is drawing showing the result of having examined the creatine kinase concentration in an example 4.

[Drawing 14] It is drawing showing the result of having identified the translation product using the insect cell extract in an example 4 by Western blotting.

[Drawing 15] It is drawing at the time of Western blotting detecting the translation product by the insect cell in an example 4, rabbit reticulocyte, and the cell extract of a wheat germ.

[Drawing 16] It is drawing showing the result to which desugar chain processing of the translation reaction product by the insect cell extract in an example 5 was carried out.

[Drawing 17] It is drawing showing the result of Western blotting at the time of analyzing a translation of the CHO-insect presentation liquid in an example 8, and sugar chain qualification activity.

[Description of Notations]

10 Translation equipment, 12 The extract preparation section, 14 The translation section, 16 An inert gas feed zone, 18 An exhaust port, 20 Control section.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-325076
(P2000-325076A)

(43) 公開日 平成12年11月28日 (2000. 11. 28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テリト* (参考)
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/33		C 1 2 M 1/33	4 B 0 2 9
// C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平11-141904

(22) 出願日 平成11年5月21日 (1999. 5. 21)

(71) 出願人 597002416

原 敏夫

福岡県福岡市早良区高取 1-1-53-117

(72) 発明者 原 敏夫

福岡県福岡市早良区高取 1-1-53-117

(72) 発明者 樽井 寛

福岡県福岡市東区筈松 4-8-7 コーポ
良邦301

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外 1 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無細胞抽出液及び糖蛋白質合成系

(57) 【要約】

【課題】 翻訳活性、糖修飾活性を有する細胞抽出液の調製を提供する。

【解決手段】 昆虫細胞をミニボンベ内に収容し、ミニボンベ内に窒素ガスを供給し、加圧する。この圧力を一気に排出し、細胞を破碎し、細胞抽出液を得る。この方法は従来のホモジナイザーを用いた細胞破碎方法によりも緩和な方法であることから、翻訳因子だけでなく、糖鎖修飾活性を担持する因子をも回収可能となり、これにより、翻訳から翻訳後の糖鎖修飾まで行い得るインビトロ糖蛋白質合成系を製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞を破碎して調製され、鋳型核酸から蛋白質を合成させる活性を有する無細胞抽出液であって、

不活性ガスの雰囲気中、加圧下の前記細胞を減圧させて、前記細胞が破碎されることを特徴とする無細胞抽出液。

【請求項2】 前記細胞が動物細胞であることを特徴とする請求項1に記載の無細胞抽出液。

【請求項3】 雰囲気中に不活性ガス気流が供給されて加圧され、前記不活性ガスが雰囲気中から排出されて減圧されることを特徴とする請求項1又は2に記載の無細胞抽出液。

【請求項4】 前記不活性ガスが窒素であることを特徴とする請求項1～3に記載の無細胞抽出液。

【請求項5】 蛋白質合成活性と合成された蛋白質に糖鎖を付加する糖鎖修飾活性とを有する細胞を破碎して調製され、鋳型核酸から糖蛋白質を合成し得る無細胞抽出液であって、

前記細胞が有する蛋白質合成活性と糖修飾活性とが保存されるように不活性ガスの雰囲気中、加圧下の前記細胞を減圧させて、前記細胞が破碎されることを特徴とする無細胞抽出液。

【請求項6】 前記細胞が昆虫由来であることを特徴とする請求項5に記載の無細胞抽出液。

【請求項7】 雰囲気中に不活性ガス気流が供給されて加圧され、前記不活性ガスが雰囲気中から排出されて減圧されることを特徴とする請求項5又は6に記載の無細胞抽出液。

【請求項8】 前記不活性ガスが窒素であることを特徴とする請求項5～7のいずれかに記載の無細胞抽出液。

【請求項9】 前記加圧時の圧力が、 $2 \sim 14 \text{ kgf/cm}^2$ であることを特徴とする請求項5～8のいずれかに記載の無細胞抽出液。

【請求項10】 前記細胞が $0.25 \sim 1.5 \times 10^8$ 個/ ml に調製された状態で破碎されることを特徴とする請求項5～9のいずれかに記載の無細胞抽出液。

【請求項11】 鋳型核酸から蛋白質を合成する蛋白質合成活性を有する無細胞抽出液に、請求項5～10に記載された無細胞抽出液が添加されて糖修飾活性が補足され、

鋳型核酸から糖蛋白質を合成し得ることを特徴とする無細胞糖蛋白質合成用組成物。

【請求項12】 前記蛋白質合成活性を有する無細胞抽出液が、請求項1～4のいずれかであることを特徴とする請求項11に記載の無細胞糖蛋白質合成用組成物。

【請求項13】 糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたDNAからmRNAを転写させるmRNA合成手段と、請求項5に記載の無細胞抽出液を含み、mRNA合成手段により合成されたmRNAから糖蛋白質を合成し得る

糖蛋白質合成手段と、を備え、

前記mRNA合成手段によりDNAから転写されたmRNAに基づいて、前記糖蛋白質合成手段により糖鎖修飾された糖蛋白質が合成される、糖蛋白質合成システム。

【請求項14】 前記糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたDNAがプロモータの下流に挿入されて、前記DNAからmRNAを発現させる発現ベクターをさらに備え、

前記発現ベクターには、前記プロモータからの発現により合成されるmRNAに非翻訳領域を付加させる配列であって、前記無細胞抽出液の調製に使用された細胞内で糖鎖修飾され得る蛋白質の遺伝子由来である非翻訳領域配列が備えられていることを特徴とする請求項13に記載の糖蛋白質合成システム。

【請求項15】 前記細胞が昆虫細胞であり、前記発現ベクター内のプロモータ、非翻訳領域が、前記昆虫細胞を宿主とするウイルス由来であることを特徴とする請求項14に記載の糖蛋白質合成システム。

【請求項16】 前記ウイルスがバキュロウイルスであり、

前記プロモータ、非翻訳領域配列がバキュロウイルスのポリヘドリン由来であることを特徴とする請求項15に記載の無細胞糖蛋白質合成システム。

【請求項17】 請求項5～10のいずれかに記載の無細胞抽出液を用いて生成された糖蛋白質。

【請求項18】 蛋白質合成活性を有する細胞を破碎して、鋳型核酸から蛋白質を合成し得る無細胞抽出液を製造するための装置であって、前記細胞を収容する容器と、

前記容器内に不活性ガスを充填するガス供給部と、前記細胞が有する蛋白質合成活性を保持した状態で前記容器内の細胞を破碎し得るように、前記容器内の圧力を加圧後、減圧させる圧力制御部と、を備えた無細胞抽出液製造装置。

【請求項19】 前記細胞がさらに合成された蛋白質に糖鎖を付加させる糖鎖修飾活性を有し、

前記圧力制御部が、前記細胞が有する蛋白質合成活性及び糖鎖修飾活性を保持した状態で前記容器内の細胞を破碎し得るように、前記容器内の圧力を加圧後、減圧させることを特徴とする請求項18に記載の細胞抽出液製造装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞抽出液を用いて細胞外で蛋白質を合成させるインビトロ翻訳系に関し、特に、細胞抽出液により蛋白質合成とその後の糖鎖修飾とを共に実行させ糖蛋白質を合成し得る系に関する。

【0002】

【従来の技術】生体内の機能情報は核酸上に記録され、

この核酸を鋳型として機能分子である蛋白質が翻訳されたり、機能的RNA分子(例えばリボザイム)が転写されたりする。近年、こうした生体機能を担持した核酸、蛋白質の解析が盛んに進められ、また、その一方で、これら核酸、蛋白質の解析方法、解析手段の開発も進められている。

【0003】核酸の解析方法は、特に、ポリメラーゼ鎖増幅方法(PCR)等の開発により目覚ましく発展した。このPCRによれば、ポリメラーゼ酵素を含む無細胞の反応液中にプライマーと鋳型DNAを添加することにより、この鋳型DNAに対するDNA断片を自在に増幅させることが可能となる。すなわち、核酸については、細胞外で自在に合成、増幅させることが可能となっている。そして、ここで合成された核酸は、例えば、一次構造(塩基配列)の決定などに供され、これによって、ゲノム解析などの核酸解析の進行を加速化させるに至っている。

【0004】一方、蛋白質の解析方法においても、A.S. Spirinら(Science, 242, 1162-1164(1988))により大腸菌抽出液を利用した生体外蛋白質合成系が開発されて以来、種々の無細胞翻訳系が開発されている。このような無細胞翻訳系としては、例えば、上記大腸菌の系、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球などから調製した細胞抽出液を利用したものがある。

【0005】このうちより一般的な小麦胚芽由来の無細胞翻訳系は、小麦胚芽をガラスビーズとともに乳鉢などを用いてすりつぶし、このすりつぶされた小麦胚芽から得た細胞抽出液を用いてmRNAから蛋白質を合成させるものである。すなわち、この小麦胚芽中に存在する蛋白質合成(翻訳)活性を保持しつつ、小麦胚芽から細胞抽出液を回収し、これを用いて細胞外で自在に蛋白質を合成させることが可能となっている。

【0006】このように細胞外で蛋白質を自在に合成させることができれば、細胞で蛋白質を合成させる際の複雑な要因や煩雑さを排除して、簡便に所望の蛋白質を得ることが可能となり、蛋白質の解析等を行う上で有利となる。このような観点から、従来より、無細胞翻訳系の改良などがなされており、こうした技術が、例えば、特表平1-503119号公報、特開平4-200390号公報、特開平7-203984号公報などに開示されている。また、このような無細胞翻訳系はキットとしても市販され(Amasham社など)、広く入手可能となっている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記従来の無細胞翻訳系では、蛋白質への翻訳を行うことは可能であるが、翻訳された蛋白質の翻訳後修飾を行うことができないという問題がある。すなわち、細胞内において、蛋白質の多くは、鋳型核酸から転写されたmRNAに基づいて、蛋白質として翻訳され、この翻訳後に修飾

を受けることが知られている。この翻訳後の修飾の一つとして、糖鎖修飾がある。

【0008】この翻訳後の糖鎖修飾により付加される糖鎖は、物質間や細胞間の認識や接着に関与するシグナルやリガンドとして、蛋白質自身の機能調節因子として、又は蛋白質の保護や安定化因子として機能していると考えられている。そのため、糖鎖修飾を受ける蛋白質について生体内の機能を解析するためには、糖鎖修飾を受けた蛋白質を取得することが必要となる。

10 【0009】この糖鎖修飾は、蛋白質の特定のアミノ酸に糖鎖を付加させるものであるが、その糖鎖修飾反応は種々異なり、複雑なものであるため、上記無細胞翻訳系で合成された蛋白質に化学的に糖鎖を付加させることは容易なことではない。

【0010】このような問題から生化学的な方法、すなわち、無細胞翻訳系のように細胞抽出液を用いて細胞内の糖鎖修飾活性を利用して蛋白質に糖鎖を付加させる方法が検討され、イヌ組織由来の糖鎖修飾活性を有する抽出液が取得されている。これは、イヌの組織をホモジナイザーで破碎し超遠心分離によりゴルジ体を含むミクロソーム画分を回収することにより調製される。

20 【0011】このイヌ組織の抽出液は、従来の無細胞翻訳系とは別に使用される。具体的には無細胞翻訳系により蛋白質を合成し、この合成した蛋白質を回収した後、前記イヌ組織の抽出液内に合成蛋白質を移して糖鎖修飾が行われる。このようにイヌ組織の抽出液が取得されたことから、細胞外で生物学的に糖蛋白質の合成が可能となった。そして、ここで合成された糖蛋白質を蛋白質の機能解析などに使用することにより、従来の無細胞翻訳系で合成された糖鎖修飾が行われていない蛋白質に比して、より細胞内における反応を反映させた解析を行うことが期待できる。

30 【0012】しかしながら、従来のイヌ組織抽出液を用いた糖蛋白質の合成では、無細胞翻訳系で蛋白質を合成させた蛋白質を回収し、その後に糖鎖修飾されることになる。このように、無細胞翻訳系と糖鎖修飾系を別々に用いて糖蛋白質を合成することは、一般的に変性し易い蛋白質には好ましくなく、このような複数の過程を経ることにより基礎となる蛋白質が変性し、活性低下をもたらすことも考えられる。また、蛋白質への物理的な影響に加えて、糖蛋白質を合成するに当たり、上記のような2段階の系を準備し、これを用いて2段階で糖蛋白質を合成させることは、変性し易い蛋白質を操作する操作者にとっても高度な注意力などが要求され煩雑な作業となる。

40 【0013】また、糖鎖修飾を行い得る細胞抽出液に關しても、現在のところイヌ組織のように限定した組織由来のものが使用可能となっているにすぎず、普遍的な組織細胞から糖鎖修飾活性を回収するには至っていない。糖鎖の種類は、細胞種により異なり、このことから細胞

種により糖鎖修飾反応が異なることが予想されている。そのため、種々の細胞から糖鎖修飾活性を回収することが可能となれば、蛋白質の糖鎖修飾を自在にデザインすることも可能となる。

【0014】さらに、近年では、医薬の分野において、種々の蛋白製剤が開発されているが、この蛋白製剤の効果については、その成分となる蛋白質の糖鎖の有無、種類などに影響されることが知られている。そのため、種々細胞からの糖鎖修飾活性を回収することができれば、このような蛋白製剤の開発、改良などにも大きく貢献することが期待される。

【0015】そこで、本願発明者らは、上記課題に鑑み、蛋白質合成から糖鎖修飾までの一連の過程を一つの系内で行えるような細胞抽出液の調製について鋭意研究を行い、この研究を通して、従来の無細胞翻訳系の調製とは異なる新規な無細胞抽出液の調製を可能にし、この抽出液を利用して蛋白質合成から糖鎖修飾までの一連の過程を一つの系内で行うことを可能にした。

【0016】

【課題を解決するための手段】上記の通り、本願発明者らは、細胞抽出液の調製について検討した結果、以下のような細胞抽出液の調製を可能にした。本発明の細胞抽出液の調製は、具体的には、細胞を取り巻く環境の圧力を加圧から減圧へと変化させるという緩和な手段で細胞を破碎させ、少なくとも細胞が有する蛋白質合成活性をさらには糖鎖修飾活性をも細胞抽出液中に回収させる。

【0017】すなわち、本発明の無細胞抽出液は、細胞を破碎して調製され、鋳型核酸から蛋白質を合成させる活性を有する無細胞抽出液であって、不活性ガスの雰囲気中、加圧下の前記細胞を減圧させて、前記細胞が破碎されることを特徴とする。

【0018】上記発明によれば、従来のようなホモジナイザーのように細胞をすりつぶさず、圧力変化により細胞を破碎又は破裂させて調製される。このように圧力変化により細胞を破碎させることにより、従来のホモジナイザーのような破碎方法に比して、緩和な条件で細胞を破碎させることが可能となり、細胞内の器官などへの影響を低減させることが可能となる。

【0019】また、本発明の無細胞抽出液は、蛋白質合成活性と合成された蛋白質に糖鎖を付加する糖鎖修飾活性とを有する細胞を破碎して調製され、鋳型核酸から糖蛋白質を合成し得る無細胞抽出液であって、前記細胞が有する蛋白質合成活性と糖鎖修飾活性とが保存されるように不活性ガスの雰囲気中、加圧下の前記細胞を減圧させて、前記細胞が破碎されることを特徴とする。

【0020】このように本発明によれば、蛋白質合成（翻訳）活性と糖鎖修飾活性とを有する細胞をこれら両活性を破壊しないような圧力変化により破碎させることにより両活性を保持した細胞抽出液が調製される。これにより、従来、別に調製されていた無細胞翻訳系と糖鎖

修飾系とを合わせ持つ系として作り出すことができ、この系を利用することにより、蛋白質合成と糖鎖修飾とを一つの細胞抽出液で実行させることが可能となる。

【0021】さらに、本発明は無細胞糖蛋白質合成用組成物を提供する。この無細胞糖蛋白質合成用組成物は、蛋白質合成活性を有する細胞抽出液に上記糖鎖修飾活性を有する細胞抽出液を添加して構成される。このように糖鎖修飾活性を有する細胞抽出液を、それ自身では蛋白質合成活性のみを有する細胞抽出液に添加することにより、糖鎖修飾活性を補足して、蛋白質合成活性とともに糖鎖修飾活性をも有する組成物を構成させることができる。

【0022】また、本発明は、糖蛋白質合成システムを提供する。この糖蛋白質合成システムは、糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたDNAからmRNAを転写させるmRNA合成手段と、上記蛋白質合成活性と糖鎖活性とを有する無細胞抽出液又は組成物によりmRNA合成手段により合成されたmRNAから糖蛋白質を合成し得る糖蛋白質合成手段と、を備え、前記mRNA合成手段によりDNAから転写されたmRNAに基づいて、前記糖蛋白質合成手段により糖鎖修飾された糖蛋白質が合成されることを特徴とする。

【0023】本システムによれば、鋳型DNAさえ準備すれば、この鋳型DNAからmRNAを介して簡便に糖蛋白質を合成させることが可能となる。

【0024】また、上記糖蛋白質合成システムには、さらに前記糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたDNAをプロモータの下流に挿入させ、前記DNAからmRNAを発現させる発現ベクターを備えることができる。このように、さらに発現ベクターを備えることにより、例えば、ゲノム中の興味のある遺伝子を切り出し、本発現ベクターに接続することにより、糖蛋白質を簡便に合成させることが可能となる。

【0025】上記発現ベクターには、前記プロモータからの発現により合成されるmRNAに非翻訳領域を付加させる配列であって、前記無細胞抽出液の調製に使用された細胞内で糖鎖修飾され得る蛋白質の遺伝子由来である非翻訳領域配列が備えられていることを特徴とする。このように当該細胞内で糖蛋白質を生成する遺伝子の非翻訳領域を備えることにより、合成蛋白質への糖鎖修飾の効率を向上させることが可能となる。

【0026】また、上記本発明による無細胞抽出液、組成物、糖蛋白質合成システムを用いれば簡便に糖蛋白質が生成できることから、糖蛋白質を用いた細胞内の機能解析を容易に行うことが可能となる。

【0027】さらに本発明は、無細胞抽出液製造装置を提供する。この無細胞抽出液製造装置は、蛋白質合成活性を有する細胞を破碎して、鋳型核酸から蛋白質を合成し得る無細胞抽出液を製造するための装置であって、前記細胞を収容する容器と、前記容器内に不活性ガスを充

填するガス供給部と、前記細胞が有する蛋白質合成活性を保持した状態で前記容器内の細胞を破碎し得るように、前記容器内の圧力を加圧後、減圧させる圧力制御部と、を備えたことを特徴とする。

【0028】また、上記無細胞抽出液製造装置は、前記細胞がさらに合成された蛋白質に糖鎖を付加させる糖鎖修飾活性を有し、前記圧力制御部が、前記細胞が有する蛋白質合成活性及び糖鎖修飾活性を保持した状態で前記容器内の細胞を破碎し得るように、前記容器内の圧力を加圧状態から減圧状態へと変化させることを特徴とする。

【0029】これら無細胞抽出液製造装置を用いれば、蛋白質合成活性を有する細胞抽出液又はさらに糖鎖修飾活性をも有する細胞抽出液を簡便に製造することが可能となる。

【0030】

【発明の実施の形態】以下、本発明の好適な実施形態を用いて説明する。

【0031】[無細胞抽出液の調製]無細胞抽出液は、不活性ガスの雰囲気中、加圧下の細胞の圧力を減圧することにより、細胞を破碎して調製される。

【0032】上記無細胞抽出液の調製に使用できる細胞は、鋳型核酸から蛋白質を合成させる翻訳活性と、翻訳後の糖鎖修飾を実行する糖鎖修飾活性を有する細胞であれば、いかなる細胞でもよく、原核細胞から真核細胞まで広く含めることができる。例えば、ほ乳類、鳥類、は虫類、両生類、魚類、植物、微生物等の細胞が挙げられる。そして、こうした幅広い細胞のうち翻訳活性を回収し得る細胞は好適には哺乳動物細胞、昆虫細胞などを採用することができる。また、翻訳活性と糖鎖修飾活性を回収する場合には、昆虫細胞などを好適に使用することができる。なお、これらの細胞は、組織中の又は組織から採取した細胞でもよく、また培養細胞であってもよい。

【0033】上記細胞は、破碎を行う間中、不活性ガスの雰囲気中に配置される。この不活性ガスは、細胞破碎後の抽出液が空気と接触して翻訳活性等に影響を与えないように用いられる。従って、この目的が達成できるものであれば、不活性ガスの種類に限定はなく、例えば、窒素ガス、アルゴンガスなどを使用することができる。

【0034】上記細胞を破碎する際の加圧時の圧力は、細胞種により適宜決定することができる。この圧力は、用いる細胞の外周を覆う膜や壁などの強度、内部の翻訳、翻訳後の修飾に関する因子の耐圧性などを考慮して、最終的に採取される抽出液の翻訳活性を指標として決定することができる。例えば、昆虫由来の細胞の場合には、 $2 \sim 14 \text{ kgf/cm}^2$ とすることができ、より好ましくは、 $5 \sim 8 \text{ kgf/cm}^2$ とすることができ、さらに好ましくは 8 kgf/cm^2 とすることができる。また、CHO細胞の場合には、昆虫細胞よりも比較

的高い圧力であることが好適であり、具体的には $2 \sim 3 \text{ kgf/cm}^2$ とすることができる。

【0035】また、加圧時間も各細胞種等により適宜決定することができる。この決定に当たっても、用いる細胞の外周を覆う膜や壁などの強度、内部の翻訳、翻訳後の修飾に関する因子の耐圧性などを考慮して、最終的に調製される抽出液の翻訳活性を指標とすることができる。例えば、昆虫由来の細胞の場合には、 $3 \sim 120$ 分間、好ましくは、 30 から 120 分間、さらに好ましくは $60 \sim 90$ 分間とすることができる。

【0036】また、加圧後の減圧は、細胞を破碎し得るように急激に圧力を減少させればよく、減圧後際の圧力は、常圧程度あるいは圧力を機械的に引き常圧よりもさらに低い圧力とすることもできる。

【0037】上記加圧状態から減圧状態への圧力変化は、細胞が収容された雰囲気内へのガスの供給及び排出により、又は細胞が収容される体積の縮減、拡張により行うことができる。ここで前者のガスの供給及び排出による場合には、このガスとして上記不活性ガスを好適に用いることができる。

【0038】最終的に、細胞破碎後の抽出液を回収することにより無細胞抽出液が調製される。この無細胞抽出液とは、主として、生存細胞内の細胞液と区別する意味で用いられ、上記破碎後の細胞残渣の混在の有無は問わない。従って、上記の破碎後の細胞抽出液は、残渣が存在する状態として、又、必要に応じて破碎された細胞の残さを遠心分離などにより除去した上で、無細胞抽出液とすることができる。

【0039】また、ここで調製された無細胞抽出液は、特定の細胞由来のものを単独で使用することもできるが、特定の細胞由来の抽出液の単独使用によっては蛋白質合成活性は有するが糖鎖修飾活性が低い又は発揮しない場合には、糖鎖修飾活性を有する他の細胞由来の無細胞抽出液を適当な割合で添加して糖鎖修飾活性を補足させることができる。例えば、CHO細胞由来の無細胞抽出液のように、単独使用によっては蛋白質合成活性は有するが糖鎖修飾活性を発揮しない場合に、昆虫細胞由来の糖鎖修飾活性をも有する無細胞抽出液などを適宜添加して、糖鎖修飾活性を補足させることもできる。

【0040】[糖蛋白質合成システム]次に、上記無細胞抽出液を用いて、翻訳、糖鎖修飾を行ための基質となる鋳型核酸について説明する。

【0041】1、発現ベクター

蛋白質合成(翻訳)に当たっては、その鋳型としてmRNAが必要となり、また、このmRNA生成(転写)には、その鋳型としてDNAが必要となる。ここでは、このmRNA合成の基礎となる鋳型DNAを含む発現ベクターについて説明する。

【0042】発現ベクターには、蛋白質合成の基礎となるmRNAを合成するために、蛋白質をコードした所望

の配列が挿入される。この蛋白質コード配列は、特に限定はないが、上記無細胞抽出液が蛋白質合成後の糖鎖修飾も行い得るため、この蛋白質コード配列としては、糖鎖修飾され得る蛋白質をコードした配列を好適に用いることができる。

【0043】上記発現ベクターにおいて、上記蛋白質をコードした配列の上流には転写を開始させるプロモータが備えられる。このプロモータとしては、特に限定はないが、一本鎖のmRNAを合成するためには、種々のRNAポリメラーゼプロモータを好適に用いることができる。その例として、T7 RNAポリメラーゼプロモータ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ等が挙げられる。

【0044】また、発現ベクターには、上記蛋白質コード配列を挟むように、その両端に隣接して5'、3' 非翻訳領域(UTR)配列が備えられ、これら配列は、mRNAとして合成された際にmRNAの両端にUTRとして付加され翻訳の制御を行う。このUTR配列は、無細胞抽出液を用いて翻訳を行わせる際に制御配列として機能するため、この配列は無細胞抽出液の調製に使用された細胞に応じて選択することが好ましく、例えば、当該細胞由来のUTR又はこのような細胞に感染するウイルス、ファージなどに由来するUTRを用いることができる。

【0045】例えば、上記無細胞抽出液の調製に昆虫細胞を用いた場合には、このUTRとしては昆虫細胞由来のUTR又は昆虫細胞に感染能を有するウイルス、例えばバキュロウイルスなどに由来するUTRを用いることができる。

【0046】また、上記発現ベクターには、自己複製能を保持させることが好ましい。このような自己複製能は種々のプラスミド、ウイルスDNAなどが有する自己複製能を利用することができる。これらは、この発現ベクターを増幅させるための宿主又は本ベクターによる発現を行わせるための宿主に応じて適宜選択することができる。例えば、宿主として大腸菌を選択する場合には、発現ベクターとしてpUC系、pBR系プラスミドを用いることができる。また、哺乳動物細胞を宿主とする場合には、SV40等のウイルスDNA等を好適に利用することができる。必要であれば、複数の自己複製能を備えさえ、異なる宿主において自己複製能を有するシャトルベクターとして構成することもできる。

【0047】2. mRNAの合成

上記発現ベクターを用いてmRNAを合成させるには、RNAポリメラーゼなどの転写因子が必要となる。このような転写因子は、生存細胞が保持する転写因子を利用することができる。すなわち、この生存細胞内に上記発現ベクターを導入し、細胞内の転写因子を利用してmRNAを合成させることができる。ここで合成されたmRNAは、既知の方法に従って細胞内の他のmRNAから

分離精製することにより、目的のmRNAが調製される。

【0048】上記のように細胞内の転写因子を利用した場合には、細胞内の無数のmRNAから目的のmRNAを精製することが必要となるが、このようなmRNA精製操作を簡略化するためには、この転写因子は、細胞から採取した転写活性を有する抽出液、インビトロ転写系を利用することができる。インビトロ転写系としては、例えば、T7ファージ由来の転写反応系、大腸菌由来の転写反応系等を例示できる。この系を用いたmRNA合成は、市販のキット、例えばMEGAscript™ (Ambion社)、RiboMAX™ (Promega社)などを利用して実施することができる。

【0049】このようにmRNAの合成(転写工程)をインビトロで行った場合には、mRNA合成(転写)工程から後述する蛋白質合成(翻訳)及びその後の糖鎖修飾工程までの一連の工程を細胞外、すなわちインビトロで実行させることが可能となる。

【0050】3. 蛋白質の翻訳、糖鎖修飾

インビトロ翻訳及び糖鎖修飾反応は、基本的に上記蛋白質合成活性並びに糖鎖修飾活性を有する無細胞抽出液に、上記mRNAを添加することにより実行することができる。すなわち、上記無細胞抽出系には、蛋白質合成する翻訳活性と、この翻訳後の糖鎖修飾活性とを有しているため、上記無細胞抽出系へのmRNAの添加により、当該mRNAから蛋白質が合成され、その後、この蛋白質に対する糖鎖修飾が行われて糖蛋白質が合成される。

【0051】また、上記において糖蛋白質を合成するに当たっては、細胞抽出液に酢酸マグネシウム、酢酸カリウム、スベルミジン、GTP、ATP、クレアチンキナーゼ、バッファなどを添加して、細胞抽出液を調製することができる。一例として、昆虫細胞の細胞抽出液においては、最終濃度を10.6mM HEPES-KOH (pH7.95)、1.3mM酢酸マグネシウム、100mM酢酸カリウム、2.5mM DTT、0.25mMスベルミジン、44.4μg/mlクレアチンキナーゼ、8.0mMリン酸クレアチン、1.2mM ATP、0.25mM GTPに調製し、翻訳反応に供することができる。また、細胞抽出液に、アミノ酸混合液を添加することが好適である。この混合液は、例えば、終濃度が25μM程度になるように添加することができる。

【0052】また、蛋白質合成に当たっては、mRNAを細胞抽出液に添加する必要があるが、この添加量は、従来のインビトロ翻訳系と同様な添加量とすることができ、例えば、細胞抽出液に対して終濃度200μg/mlとなるように添加することができる。このような方法で合成された蛋白質は、必要に応じて細胞抽出液から分離された後、種々の目的にこの合成蛋白質(又は糖蛋白質)を利用することができる。

【0053】[翻訳装置]上記細胞抽出液の調製から、蛋白質(糖蛋白質)の合成までを自動化してもよい。このような装置は次のように構成することができる。

【0054】翻訳装置10は、細胞から無細胞抽出液を調製するための抽出液調製部12と、この抽出液を用いて蛋白質合成を行わせる翻訳部14とが設けられる。

【0055】この抽出液調製部12は、内部に細胞が収容され、この内部で細胞が破碎され、抽出液が調製される。この細胞の破碎は、抽出液調製部12の内部の圧力変化により実行される。この圧力変化を実行するため、抽出液調製部12には、不活性ガスを収容し、前記抽出液調製部に不活性ガスを供給するための不活性ガス供給部16が設けられている。すなわち、この不活性ガス供給部16は、不活性ガスを抽出液調製部12へ送り込むことにより、調製部12の内部の圧力を上昇させ、収容された細胞に圧力を加える。また、この不活性ガス供給部16から供給された不活性ガスは、細胞破碎後の抽出液が空気(酸素)と接触することを防止し、抽出液中の種々の活性低下を防止する。

【0056】また、上記抽出液調製部12には、送り込まれた不活性ガスを排出し、調製部12の内部の圧力を減圧させ、細胞を破碎(破裂)させるための排出口18が設けられる。

【0057】これら抽出液調製部12への不活性ガスの送込み、その排出により圧力変化を制御するために、抽出液調製部12には、制御部20が備えられる。この制御部20は、細胞を被覆する膜、壁の強度などに応じた制御を可能とし、細胞破碎後の細胞抽出液中に蛋白質合成活性、糖鎖修飾活性を回収させる。

【0058】一方、翻訳部14は、上記抽出液調製部において調製された抽出液が供給可能となるように前記抽出液調製部12に接続される。この翻訳部14の内部に、図1には示していないが反応容器が備えられ、この反応容器に前記抽出液が注入される。また、この翻訳部14には、試料注入部が備えられ、この試料注入部により蛋白質合成の基質となるmRNAが反応容器に注入される。

【0059】上記翻訳装置10によれば、細胞を抽出液調製部12に供給することにより、抽出液調製部12において細胞が破碎され、細胞抽出液が調製される。そして、ここで調製された細胞抽出液は、翻訳部14において、反応容器内に供給され、これにmRNAが添加されて、糖蛋白質の合成が行われる。

【0060】なお、上記翻訳装置において、必要であれば、発現ベクターからmRNAを生成させる転写部を備え、この転写部において翻訳装置に供給するmRNAを生成させてもよい。このように、転写部を備えた場合には、発現ベクターからmRNAを介して糖蛋白質の合成までの一連の工程を自動化させることが可能となる。

【0061】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0062】[実施例1] 発現ベクターの調製
糖鎖修飾されることが知られている蛋白質として、HIV(ヒト免疫不全症ウイルス)のGP120を用い、この糖蛋白質のインビトロの合成を試みた。この糖蛋白質の合成に当たり、このgp120 mRNAを発現させる発現ベクターを以下の通り構築した。なお、図2に発現ベクターの構築方法を模式的に、図3には、発現ベクターから発現されるポリヘドリンUTRを備えたgp120 mRNAの構成を示した。また、このポリヘドリン5'-UTRの塩基配列を配列番号1に、3'-UTRの塩基配列を配列番号2に示す(Robert, D.ら, Virology 185, 229-241 (1991))。

【0063】図2において、まず、pVL1393-gp120プラスミドをPCRにより、点変異を挿入し、gp120の両端にEcoRIとSalIの認識部位を形成させた。この変異挿入後のプラスミドをEcoRIとSalI制限酵素で切断し、若干両端が欠けているgp120'断片を単離した。一方、発現ベクターの骨格となるプラスミドpUC18も同様にEcoRIとSalI制限酵素で切断し、そこに上記gp120'断片を挿入し、pUC18-1とした。

【0064】次に、XhoI又はSalIを末端に有する2つのプライマーを用いて、PCRによりpVL1393-gp120プラスミドからgp120の3'端の残りの配列と3'UTR配列を増幅させ、この増幅断片をpUC18-1のSalI部位に挿入し、これをpUC18-2とした。

【0065】gp120の5'端の残りの配列及び5'UTR配列は、合成により生成し、この合成の際に、5'UTRの上流にT7RNAポリメラーゼプロモータ配列番号3を付加した。さらに、この合成断片はPCRにその両端にEcoRI部位が挿入され、この断片をpUC18-2のEcoRI部位に挿入させた。これにより、T7RNAポリメラーゼプロモータ配列の下流にUTR配列を含むgp120発現カセットが挿入されたpUC18-gp120プラスミドが生成された。

【0066】このpUC18-gp120プラスミドを、MEGAscript™(Ambion社)を用いてインビトロにて転写させ、図3に示すgp120 mRNAを調製した。以下、このgp120 mRNAを鋳型として糖蛋白質の合成における種々の検討を行った。

【0067】(1)細胞数の影響
細胞抽出液の調製には、昆虫細胞Sf21細胞(J. L. Vaughn, R. H. Goodwin, G. L. Tompkins, and P. McCawley, In Vitro, 13, 213-217 (1977))を用いて行った。Sf21細胞の異なる細胞濃度の細胞懸濁液をミニボンベ(MIN I-BOMB CELL DISRUPTION CHAMBER (KONTES社製))内に

それぞれ入れ、窒素ガス圧8kgf/cm²で、30分間処理した。この処理後の各細胞液を遠心分離（BECKMAN社製L7Ultracentrifuge 55型、ローターSW40Tiロータ、14000rpm×15min）により、細胞抽出液を得た。

【0068】上記で調製された細胞抽出液を用いて翻訳能を調べた。翻訳能の解析を行うために、上記gp120 mRNAを最終濃度200μg/mlとなるように細胞抽出液に添加し、翻訳反応を実行させた。反応後の蛋白質を2つの方法で定量した。一つは、ビオチン標識リ*

細胞数の影響

	細胞密度 (10 ⁸ cells/ml)			
	1.5	1.0	0.5	0.25
翻訳能 (%)	91	100	44	1.7

表1に示すように、細胞抽出液が翻訳能を維持するために好ましい細胞数は0.25~2.5×10⁸個/mlの範囲で、特に1.0×10⁸個/mlの細胞数が最適であった。

【0070】(2) 窒素ガス圧の影響

ミニボンベ中の窒素ガス圧を2~14kgf/cm²の範囲で翻訳能に及ぼす影響を上記と同様に検討した。細胞数は上記20において最適であった細胞数1.0×10⁸個/mlとし、窒素*

窒素ガス圧の影響

	窒素ガス圧 (kg/cm ²)		
	5	8	14
翻訳能 (%)	99	100	64

表2に示すように、窒素ガス圧は、2~14kgf/cm²の範囲とすることができ、好ましくは、5~8kgf/cm²の範囲とすることができる。最適には、窒素ガス圧は、8kgf/cm²であった。

【0072】また、図4には、5、8、14kgf/cm²の加圧条件で調製したSf細胞抽出液を用いて、gp120 mRNAから蛋白質を合成し、ここで合成された蛋白質を分画した際に分画パターンを示す。図4のレーン2、4、6に示すように、5~14kgf/cm²の加圧条件により調製された細胞抽出液において、mR★

窒素ガスによる加圧時間の影響

	加圧時間 (分)							
	3	5	10	15	30	60	90	120
翻訳能 (%)	25	40	56	63	76	100	100	46

表3に示すように、3分間以上の加圧時間であればよく、特に30~60分間の加圧時間が好適であった。

【0075】(4) 噴出速度の影響

ミニボンベ内から細胞破碎液を噴出させる速度を15~20ml/secの範囲で検討した。噴出速度は翻訳能に影響を及ぼさなかった。

【0076】[実施例3] 翻訳反応条件の検討

(1) mRNA濃度の至適化

翻訳反応の際における細胞抽出液へのmRNA添加量の

* ジンtRNAの翻訳産物への取込み量をアビジンにより検出する方法である。他の方法は、GP120の抗体を用いたウエスタンブロッティング法により翻訳産物を検出し、検出した産物をDensitrometer (FastScan, Molecular Dynamics社製) で定量する方法を採用した。これら定量法により翻訳能を評価した。その結果を表1に示す。

【0069】

【表1】

* ガス処理時間は30分間に設定して細胞を破碎した。得られた細胞抽出液にgp120 mRNAを最終濃度200μg/mlとなるように添加し、翻訳反応を実行させた。各ガス圧条件下での蛋白質合成量から翻訳能を比較した。その結果を表2に示す。

【0071】

【表2】

★ NAから特異的に糖蛋白質（図4において、矢印1として示す）が合成されていることが示され、特に、8、14kgf/cm²の加圧条件による細胞抽出液において良好な糖蛋白質合成が検出された。

【0073】(3) 窒素ガス加圧時間の影響

細胞数を1.0×10⁸個/ml、窒素ガス圧を8kgf/cm²とし、細胞抽出液を調製するための窒素ガス加圧時間を検討した。

【0074】

【表3】

検討を行った。上記Sf細胞抽出液にgp120 mRNAを3、125μg/mlから400μg/mlまで順次2倍濃度となるようにそれぞれ添加し、翻訳能、糖鎖修飾能を測定した。その結果を図5に示す。なお、図5において、丸印は、糖鎖がついていないGP120を、菱形印は、糖鎖が付加されていないGP120を示す。

【0077】図5に示すように、200μg/mlにおいてGP120（糖鎖未付加）の生成が高く翻訳能を効率的に利用することができることが示された。一方、糖

蛋白質は、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であれば、ほぼ一定の高い値を示した。

【0078】(2) 反応温度及び反応時間の影響
翻訳反応時の温度条件を検討した。細胞抽出液に gp120 mRNA を最終濃度 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、 $15^\circ\text{C}\sim 45^\circ\text{C}$ の温度下で、30、60、90分間反応を行わせ、その際の翻訳産物の生成量を測定した。なお、ここでは細胞数 1.0×10^6 個/ ml とし、窒素ガス処理時間は30分間に設定して細胞を破碎して調製された細胞抽出液を用いた。

【0079】相対生成量をグラフ化したものを図6に示す。図6に示すように、反応温度 25°C において、翻訳及び糖鎖修飾活性が示され、特に、糖鎖修飾活性においては反応時間60分の周辺に活性のピークが存在し、また翻訳活性においては、30分から60分のあたりにピークが存在することが推測された。

【0080】一方、 37°C では、 25°C に比して、翻訳及び糖鎖修飾活性が半分程度に低下し、 45°C では著しく両活性が低下した。また、 15°C では、両活性とも低い、糖蛋白質については時間に比例して生成量が上昇するパターンが示された。

【0081】なお、図7には、紫蚕の細胞を上記 Sf 細胞と同様の条件で細胞破碎を行い調製した紫蚕細胞抽出液を用いて、同様に反応温度、反応時間による GP120 の生成率を比較したグラフを示す。紫蚕においても、 25°C の反応温度で良好な翻訳及び糖鎖修飾活性が示された。

【0082】(2) 試薬などの添加の影響
細胞抽出液に種々の試薬を添加した際の翻訳能への影響を調べた。ここでは、酢酸マグネシウム、酢酸カリウム、スベルミジン、 GTP 、 ATP 、クレアチンキナーゼについて、それぞれ細胞抽出液に一定の範囲の濃度で添加し、 gp120 mRNA からの蛋白質又は糖蛋白質の生成量を相対的に定量し、翻訳能、糖鎖修飾能を検討した。

【0083】図8に酢酸マグネシウム濃度を検討した結果を示す。なお、図8において、丸印は、糖鎖がついていない GP120 を、菱形印は、糖鎖が付加された GP120 を示す。

【0084】図8に示すように、酢酸マグネシウムについては、 1.5mM において良好な翻訳活性が示され、また、糖鎖修飾活性については、 2mM において良好な結果が示された。

【0085】図9に酢酸カリウム濃度を検討した結果を示す。酢酸カリウムについては、 100mM において、翻訳活性及び糖鎖修飾活性が高いことが示された。なお、図9において、図8と同様に丸印は、糖鎖がついていない GP120 を、菱形印は、糖鎖が付加された GP120 を示す。

【0086】図10には、スベルミジン濃度を検討した

結果を示す。スベルミジンについては、 0.25mM において、蛋白生成量(糖非付加)がもっとも高く、 0.25mM が好適であることが示された。なお、図10(以下、図11、12、13においても同様)において、実線は、糖鎖がついていない GP120 を、点線は、糖鎖が付加された GP120 を示す。

【0087】図11には、 GTP 濃度を検討した結果を示す。 GTP については、 0.25mM において、蛋白生成量(糖非付加)がもっとも高く、この濃度範囲において効率良く翻訳が行われることが示された。一方、糖蛋白質の生成は GTP 濃度に大きく影響されないことが示された。

【0088】図12には、 ATP 濃度を検討した結果を示す。 ATP については、 $1\sim 1.5\text{mM}$ において、蛋白生成量(糖非付加)がもっとも高く、この濃度範囲において効率良く翻訳が行われることが示された。一方、糖蛋白質の生成は 0.5 において若干高い値が示されているが、 ATP 濃度に大きく影響されないことが示された。

【0089】図13(a)(b)において、クレアチンキナーゼ濃度を検討した結果を示す。図13(a)(b)に示すように、2回の実験を通して、翻訳活性は $400\mu\text{g}/\text{ml}$ でもっとも良好な結果が示された。一方、糖鎖修飾活性については、 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上において良好な結果が示された。

【0090】これら結果を総合して、以下に示す実施例においては細胞抽出液を次の組成に調製して、 25°C にて翻訳反応を行った。

【0091】

30	虫細胞抽出液	$\text{A260}=30.4$
	$\text{HEPES-KOH (pH7.95)}$	終濃度 10.6mM
	酢酸マグネシウム	終濃度 1.3mM
	酢酸カリウム	終濃度 100mM
	DTT	終濃度 2.5mM
	スベルミジン	終濃度 0.25mM
	クレアチンキナーゼ	終濃度 $444\mu\text{g}/\text{ml}$
	リン酸クレアチン	終濃度 8.0mM
	ATP	終濃度 1.2mM
	GTP	終濃度 0.25mM
40	アミノ酸混液	終濃度 $25\mu\text{M}$
	mRNA	終濃度 $200\mu\text{g}/\text{ml}$

【実施例4】昆虫細胞抽出液を利用した翻訳産物の同定
 HIV 患者抗血清を用いたウエスタンブロッティングにより、上記昆虫細胞抽出液を用いて合成された翻訳産物 GP120 を解析した。解析結果を図14、図15に示す。

【0092】図14に示すように、 GP120 は、 SDS-PAGE 上で 90kDa と 56kDa に相当する位置に検出された(レーン2、3)。一方、バキュロウイルス-昆虫細胞系で Sf21 細胞により発現した GR120 は糖蛋白質で、 90

kDaの位置に非常に強いバンドとして検出される(レーン5、6)。このことはSf細胞抽出液を用いて合成された翻訳産物に糖鎖が付加されている可能性を示唆する。

【0093】一方、ウサギ網状赤血球と小麦胚芽から調製したコントロールの細胞抽出液において、得られた翻訳産物は56kDaの位置に強くバンドが検出され(図15、レーン4、6)、昆虫細胞抽出液(レーン2)を用いて合成された翻訳産物のように90kDaの位置に相当するバンドは検出されなかった。このことは、昆虫細胞抽出液で合成されたGP120においてのみ糖鎖付加などの翻訳後修飾が行われた可能性が強く示唆された。

【0094】[実施例5] 翻訳反応産物の脱糖鎖 実施例4によりSf21細胞抽出液を用いて翻訳反応により合成された翻訳産物GP120が糖鎖修飾された糖蛋白質であることを確認するために、糖分解酵素を用いて翻訳産物GP120を処理した。ここでは糖分解酵素として、N-glycosidaseF、endo-glycosidaseFあるいはendo-glycosidaseHなどのN型糖鎖分解酵素を用いた。分解反応の結果を図16に示す。

【0095】図16に示すように、GP120を上記N型糖分解酵素で処理した結果、無処理の画分に存在する90kDaのバンドが消失し、それに変わって、無処理のサンプルでは認められない位置(矢印で示す位置)に新たな蛋白質のバンドが検出された。これは、脱糖鎖により生じたバンドシフトであることを示し、翻訳反応産物GP120にN型糖鎖が付加されていることを強く示唆した。なお、同様にO-glycosidaseでも処理を行ったが、O型糖鎖の付加は認められなかった(図示せず)。*

*【0096】また、翻訳産物が糖鎖を有するかを他の方法により検討した。上記GP120蛋白質をレクチン-セファロースカラムに供し、メチル- α -D-マンノピラノシドにより溶出させて分画を行った。そして、ここで得られた素通り画分と、メチル- α -D-マンノピラノシドによる溶出画分とを、HIV患者抗血清を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、メチル- α -D-マンノピラノシドによる溶出画分のみ、上記90kDaに相当する位置にgp120のバンドが検出された(図示せず)。このことから、翻訳産物GP120が、糖鎖を有する糖蛋白質であることを強く示唆した。

【0097】[実施例6] 種々のmRNAを用いた糖蛋白合成解析

UTR、シグナル配列などの制御配列、および糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたコード配列について、上記実施例とは異なるmRNAを調製して、翻訳、糖鎖修飾が行われるかを調べた。なお、ここで用いたUTRは、バキュロウイルスのポリヘドリン由来、ウシ成長ホルモン(BGH)由来のものを用いた。またシグナル配列としては、インターロイキン6(IL6)由来(配列番号5)、ニフトリリゾチーム(cL)由来(配列番号4)を用いた。また、コード配列は、共通してインターロイキン6(IL6)コード配列を用いた。これらは実施例1と同様にpUC18を用いて発現プラスミドとして構築され、これを用いてmRNAを生成し、以下の翻訳、糖鎖修飾活性を調べた。その結果の一覧を表4に示す。

【0098】

【表4】

		翻訳/糖付加		昆虫	紫蚕	ウサギ	小麦胚芽
1	BMV タンパク2a	翻訳		+	+	++	+
2	タンパク2a	翻訳		±	±	++	++
3	外被タンパク	翻訳		+	+	±	++
4	SF162 gp120	翻訳		+	+	+	+
		糖付加		+	+	-	-
発現系		5'-UTR	シグナル	コードタンパク	3'-UTR		
5	ppIL1L6p	*リヘトリ	IL6	IL6	*リヘトリ	翻訳	-
6	ppCIL6p	*リヘトリ	cL	IL6	*リヘトリ	翻訳	ND
						糖鎖付加	+
7	pp(-)IL6p	*リヘトリ	なし	IL6	*リヘトリ	翻訳	+
8	pBIL1L6B	BGH	IL6	IL6	BGH	翻訳	-
9	pBCIL6B	BGH	cL	IL6	BGH	翻訳	-
10	pB(-)IL6B	BGH	なし	IL6	BGH	翻訳	-
11	ppCIL6B	*リヘトリ	cL	IL6	BGH	翻訳	+
						糖鎖付加	+
12	pBCIL6p	BGH	cL	IL6	*リヘトリ	翻訳	-

a) cL: chicken lysozyme

b) BGH: bovine growth hormone

c) ND: not determined

実施例1に示したSF162gp120のmRNAを用いた解析では、昆虫Sf細胞及び紫蚕由来の抽出液にお

いて、翻訳、糖鎖修飾活性が確認されたが、コントロールのウサギ網状赤血球、小麦胚芽由来の細胞抽出液にお

いては、翻訳活性は認められたが、昆虫細胞などのように糖鎖修飾活性は検出されなかった。

【0099】また、種々制御配列が異なるmRNAを用いた解析から（第5～12欄）、昆虫細胞抽出液においては、5' UTRにポリヘドリン由来の5' UTRを、シグナル配列としてcL由来の配列を用いた場合に翻訳、糖鎖修飾が行われることが示された（第6、11欄）。また、3' UTRは、ポリヘドリン由来であるか、ウシ成長ホルモン由来であるかを問わず、糖鎖修飾が行われた。

【0100】一方、昆虫細胞抽出液において、5' UTRにBGH由来のものをを用いた場合、及び、シグナル配列として、IL6シグナルを用いた場合には、翻訳のみ行われ、糖鎖修飾は行われなかった。このことから、5' UTR、シグナル配列が、糖鎖修飾の実行に重要であることが示された。

【0101】なお、コントロールのウサギ網状赤血球、小麦胚芽由来の細胞抽出液においては、用いたmRNAでは、糖鎖修飾は全く観察されなかった。

【0102】[実施例7] CHO細胞を用いた検討 哺乳動物細胞の細胞抽出液において、上記昆虫細胞と同*

* 様に、翻訳及び糖鎖修飾活性を有するかを検討した。ここでは、哺乳動物細胞としてCHO細胞を用いて、上記昆虫細胞の細胞抽出液の調製条件と同様の方法で、CHO細胞抽出液を調製した。また、このCHO細胞の細胞抽出液の翻訳能などの解析にあたり、3種のmRNAを調製した。これらmRNAは、以下の表5に示す通り、
(1) gp120 (HIV-1 SF162由来) コード配列、ポリヘドリンUTR、gp120シグナル配列を有する第一のmRNA、(2) IL6コード配列、ポリヘドリンUTR、cLシグナル配列を備えた第二のmRNA、(3) IL6コード配列、哺乳動物用発現ベクターpRc/CMVのUTR、IL6のシグナル配列を備えた第三のmRNAである。

【0103】これら3種のmRNAを用いてCHO細胞抽出液の翻訳活性、糖鎖修飾活性を調べた。その結果を表5に示す。なお、陽性コントロールとして、翻訳、糖鎖修飾活性が確認された昆虫細胞（Sf細胞）の細胞抽出液における結果も同様に示す。

【0104】

【表5】

細胞抽出液	鋳型	鋳型タイプ	UTR	シグナル配列	翻訳	糖鎖付加
昆虫細胞	HIV-1 SF162 のgp120	バキュロ ウイルス (昆虫)	ポリヘドリン	HIV-1 SF162 のgp120	+++	+++
	ヒト型イン ターロイキ ン6	CHO細胞 (哺乳類)	ポリヘドリン	ニフトリリン チーム	+++	+++
			哺乳類用発現 ベクター pRc/CMVの UTR	ヒト型インター ロイキン6	++	++
CHO細胞	HIV-1 SF162 のgp120	バキュロ ウイルス (昆虫)	ポリヘドリン	HIV-1 SF162 のgp120	++	-
	ヒト型イン ターロイキ ン6	CHO細胞 (哺乳類)	ポリヘドリン	ニフトリリン チーム	++	-
			哺乳類用発現 ベクター pRc/CMVの UTR	ヒト型インター ロイキン6	+++	-

+ : 合成した - : 合成しない

表5に示すように、CHO細胞抽出液では、いずれのmRNAにおいても翻訳活性が検出されたが、糖鎖修飾活性を確認することはできなかった。このようにCHO細胞の細胞抽出液では、糖鎖修飾活性を確認することはできなかったが、一方、上記ガス圧の変化による細胞破砕方法は、少なくとも哺乳動物細胞から翻訳活性を有する細胞抽出液を回収することができることは示された。

【0105】また、翻訳能を比較すると、pRc/CMVのUTRを用いた場合に、翻訳能が上昇していることが示された。このことは、細胞を調製した細胞の種類と、UTRが由来する細胞種とを対応させることが、翻訳能の向上に重要であることが示された。

【0106】一方、陽性コントロールとして用いた昆虫細胞抽出液では、いずれのmRNAにおいても翻訳活

性、糖鎖修飾活性が確認された。特に、ポリヘドリンUTRを用いた場合に、翻訳活性、糖鎖修飾活性を向上させることが示された。このことから、細胞抽出液を調製した細胞に感染能を有し、生育することができる生物由来のUTRは、その細胞抽出液を用いた翻訳及び糖鎖修飾を行わせるための制御配列として好適に利用することができることが示された。

【0107】[実施例8] CHO細胞抽出液と昆虫細胞(Sf細胞)抽出液との混合組成液

上述した通り、CHO細胞抽出液では、翻訳活性が検出されたが、糖鎖修飾活性については検出することができなかった。この糖鎖修飾活性を補足するためにCHO細胞抽出液と昆虫細胞抽出液とを種々の混合割合で混合した組成液を調製し、この組成液により翻訳活性、糖鎖修*

A) IL6本来のシグナル配列使用

CHO細胞抽出液	10	9.9	9	5	0
昆虫細胞抽出液	0	0.1	1	5	10
pre-IL6	66	66	67	85	100
糖鎖付加IL6	0	0	4	43	95
シグナル切除されたIL6	0	0	3	6	33

B) IL6のシグナル配列をニフトリリゾチームのシグナル配列で置換した

CHO細胞抽出液	10	9.9	9	1	0
昆虫細胞抽出液	0	0.1	1	9	10
pre-IL6	26	29	23	31	48
糖鎖付加IL6	0	2	11	61	100
シグナル切除されたIL6	0	0	2	13	32

図17及び表6に示すように、CHO-昆虫(9.9:0.1)組成液では、IL6蛋白質は検出されたが、糖鎖修飾されたIL6蛋白質は検出されず、糖鎖修飾活性が補足されていないことが示された。

【0110】一方、CHO-昆虫(9:1)組成液及びCHO-昆虫(5:5)組成液では、コントロールの昆虫細胞抽出液単独の場合に検出される糖鎖が付加されたIL6蛋白質バンドに対応した位置にバンドが検出され、糖鎖修飾が行われることが示された。

【0111】以上より、翻訳活性のみを有する細胞抽出液であっても、他の糖鎖修飾能を有する細胞抽出液を混合することにより、糖鎖修飾活性を補足することが可能となる。この結果は、ガス圧の変化により緩和な条件でCHO細胞の細胞抽出液を調製しているものの、この細胞抽出液中において、細胞が本来有する糖鎖修飾活性を担ういずれかの因子が不足し糖鎖修飾活性を奏しない

* 飾活性を検討した。

【0108】具体的には、上記検討に当たって、mRNAは、IL6由来又はニフトリリゾチーム(cL)由来するシグナル配列を備えたIL6 mRNA(実施例6におけるppILIL6p, ppILIL6B又はppCLIL6BからのmRNA)を使用した。これらmRNAを各組成液に添加し、この組成液の一部を電気泳動により分画し、分画後、抗IL6抗体を用いたウェスタンブロッティングによりIL6蛋白質の同定及びその生成量を比較した。ウェスタンブロッティングの結果を図17に示し、デンストメータでバンド強度を定量化した値を表6に示す。

【0109】

【表6】

が、この因子が昆虫細胞抽出液により補われ糖鎖修飾活性が補足されているという可能性が示唆される。

【0112】[実施例9] 応用

上述した実施例に示した昆虫細胞の抽出液及びこれを含む組成液では、翻訳及び糖鎖修飾さらにはプロセッシングをもインビトロで行えることが示された。また、この糖鎖修飾の効率を向上させ得る制御配列をも明らかになった。こうした細胞抽出液及び制御配列を備えた発現ベクターをパッケージ化することにより、インビトロの糖蛋白質合成キットを構成することができ、簡便にインビトロで糖蛋白質、プロセッシングされた蛋白質を合成させることが可能となる。

【0113】また、上記CHO-昆虫組成液では、プロセッシングも行わせることができたことから、この組成液は、翻訳後の蛋白質のプロセッシングを解析するためのモデル系としても役立つことが期待される。すなわ

ち、不活性ガスを用いた穏和な条件下で細胞破碎を行うことにより、糖鎖修飾などに関与する膜組織が保存された状態で無細胞抽出液が回収されたことが示唆された。従って、この細胞抽出液は、糖蛋白質などを合成する際に役立つだけでなく、翻訳により合成された蛋白質（又＊

＊は先駆体）が翻訳後にいかにプロセッシング等されるかを解析する際のモデル系としても役立ち得る。

【0114】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：52

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

起源

生物名：バキュロウイルス

配列の特徴

特徴を示す記号：5' UTR

配列

GGGAGTATTT TACTGTTTTC GTAACAGTTT TGTAATAAAA AAACCTATAA AT 52

配列番号：2

配列の長さ：379

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

起源

生物名：バキュロウイルス

配列の特徴

特徴を示す記号：3' UTR

配列

AACACGATAC ATTGTTATTA GTACATTTAT TAAGCGCTAG ATTCTGTGCG TTGTTGATTT 60
ACAGACAATT GTTGTACGTA TTTTAATAAT TCATTAAATT TATAATCTTT ACGGTGGTAT 120
GTTAGAGCGA AAATCAAATG ATTTTCAGCG TCTTTATATC TGAATTTAAA TATTAATCC 180
TCAATAGATT TGTAATAATAG GTTTCGATTA GTTTCAAACA ACGGTTGTTT TTCCGAACCG 240
ATGGCTGGAC TATCTAATGG ATTTTCGCTC AAGCCACAA AACTTGCCAA ATCTTGATGC 300
AGCAATCTAG CTTTGTGCGAT ATTGTTTGT GTTTTGT TTTT GTAATAAAGG TTCGACGTCG 360
TTCAAAATAT TATGCTGCA 379

配列番号：3

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAATACGACT CACTATAGGG A 21

配列番号：4

配列の長さ：54

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

25

26

ATG AGG TCT TTG CTA ATC TTG GTG CTT TCC TTC CTG CCC CTG GCT GCT CTG 51
Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu

5

10

15

GGG 54

Gly

18

配列番号: 5

配列の長さ: 84

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GCC TTC GGT CCA GTT GCC TTC TCC CTG GGG 51

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu Gly

5

10

15

CTG CTC CTG GTG TTG CCT GCT GCC TTC CCT GCC 84

Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala

20

25

【0115】

【発明の効果】以上の通り、本発明により、新たな細胞抽出液の調製が提供され、これにより細胞から翻訳及び糖修飾能を有する無細胞抽出液を簡便に回収することが可能となった。また、本発明の無細胞抽出液を使用することにより、例えば組み換え体蛋白質に、生物界に存在する所望の糖鎖を付加することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本実施形態における翻訳装置の構成図である。

【図2】 実施例1におけるmRNA発現ベクターの構築方法を示す図である。

【図3】 実施例1における発現ベクターにより発現されるmRNAの構成図である。

【図4】 実施例4における細胞抽出液調製時のガス圧条件を検討した結果を図である。

【図5】 実施例4におけるmRNA添加量を検討した結果を示す図である。

【図6】 実施例4における好適な翻訳反応時間を検討した結果を示す図である。

【図7】 実施例4における好適な翻訳反応温度を検討した結果を示す図である。

【図8】 実施例4における酢酸マグネシウム濃度を検討した結果を示す図である。

【図9】 実施例4における酢酸カリウム濃度を検討し*

20%の結果を示す図である。

【図10】 実施例4におけるスベルミジン濃度を検討した結果を示す図である。

【図11】 実施例4におけるGTP濃度を検討した結果を示す図である。

【図12】 実施例4におけるATP濃度を検討した結果を示す図である。

【図13】 実施例4におけるクレアチンキナーゼ濃度を検討した結果を示す図である。

【図14】 実施例4における昆虫細胞抽出液を利用した翻訳産物をウエスタンブロッティングにより同定した結果を示す図である。

【図15】 実施例4における昆虫細胞、ウサギ網状赤血球、小麦胚芽の細胞抽出液による翻訳産物をウエスタンブロッティングにより検出した際の図である。

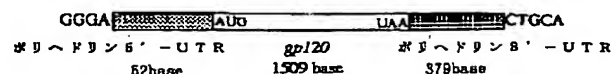
【図16】 実施例5における昆虫細胞抽出液による翻訳反応産物の脱糖鎖処理が行われた結果を示す図である。

【図17】 実施例8におけるCHO-昆虫組成液の翻訳、糖鎖修飾活性を解析した際のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

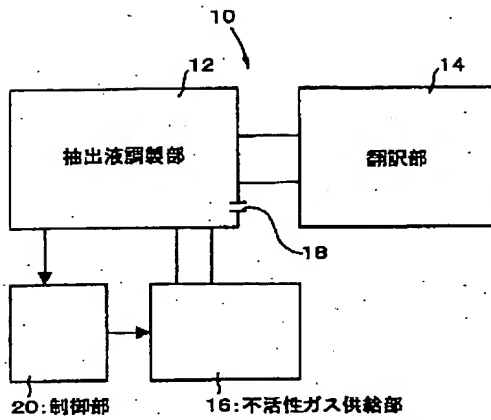
【符号の説明】

10 翻訳装置、12 抽出液調製部、14 翻訳部、16 不活性ガス供給部、18 排出口、20 制御部。

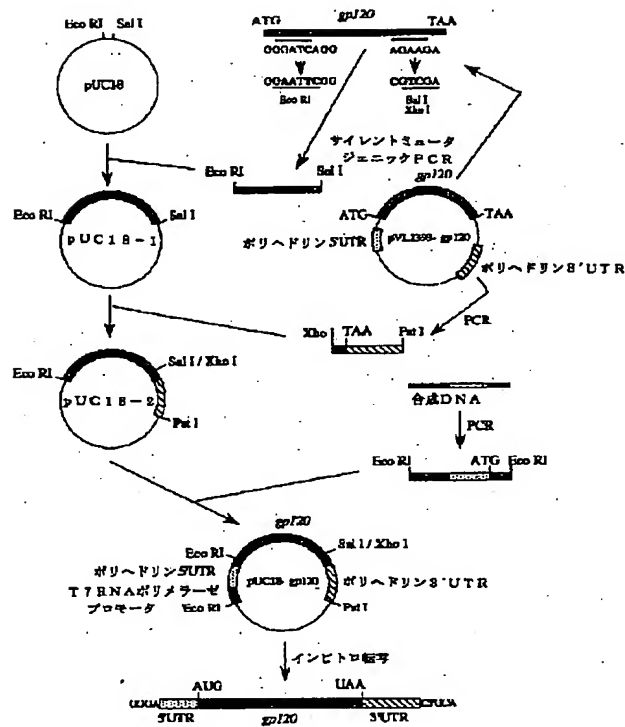
【図3】



【図1】

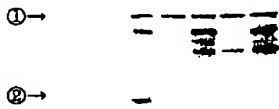


【図2】



【図4】

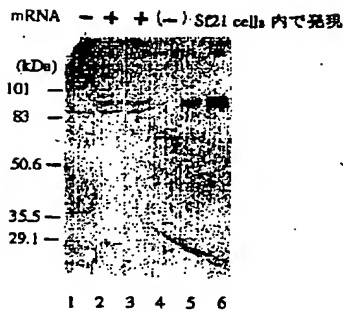
	GP120					
mRNA	-	+	-	+	-	+
ガス圧 (kg/cm ²)	5		8		14	
レーン#	1	2	3	4	5	6



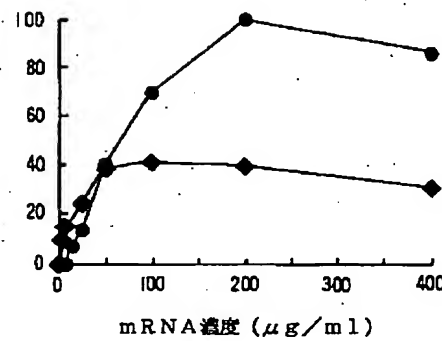
- ① 糖鎖付加したGP120
② 糖鎖がつかないGP120

【図14】

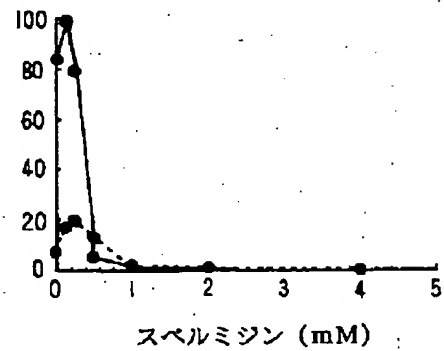
無細胞系翻訳 (-)



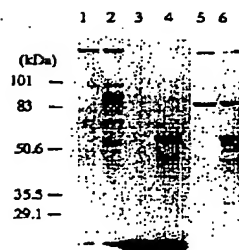
【図5】



【図10】

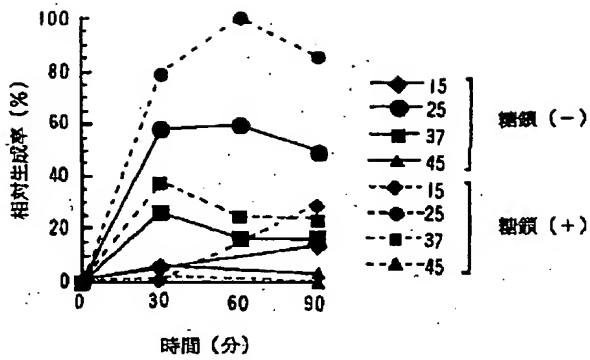


【図15】

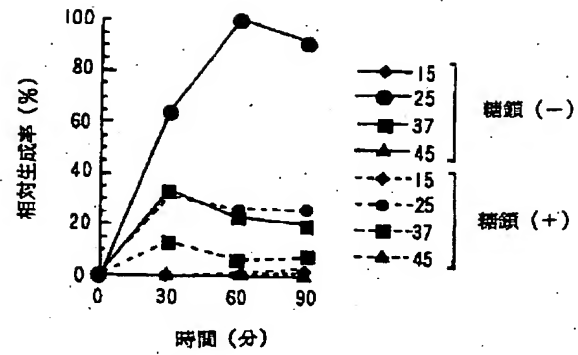


1. 昆虫細胞抽出液 mRNA (-)
2. 昆虫細胞抽出液 mRNA (+)
3. ウサギ網状赤血球ライセート mRNA (-)
4. ウサギ網状赤血球ライセート mRNA (+)
5. 小麦胚芽抽出液 mRNA (-)
6. 小麦胚芽抽出液 mRNA (+)

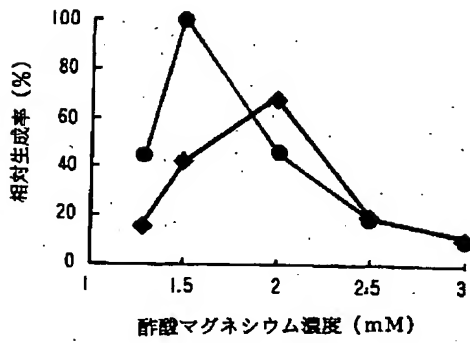
【図6】



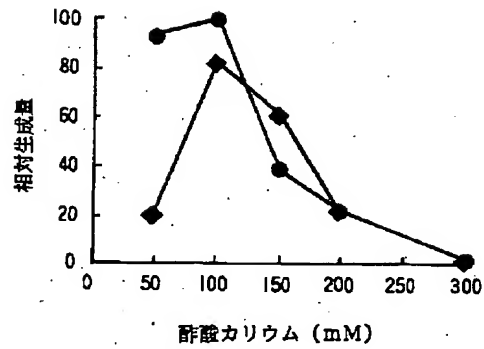
【図7】



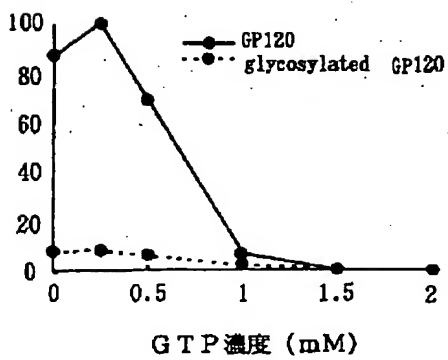
【図8】



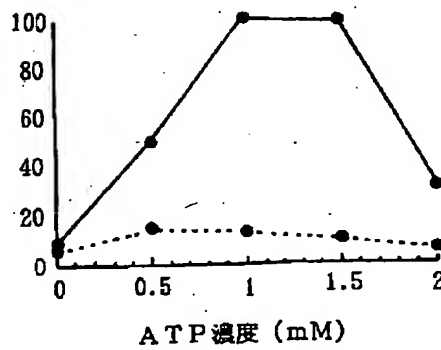
【図9】



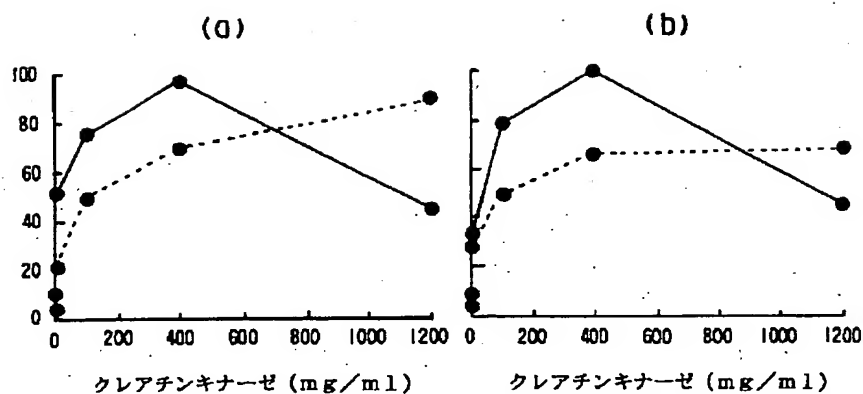
【図11】



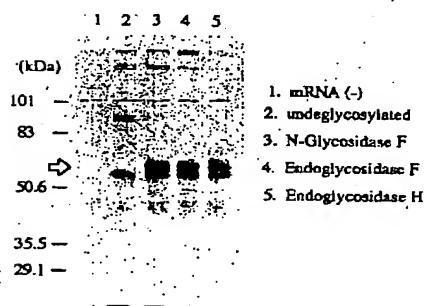
【図12】



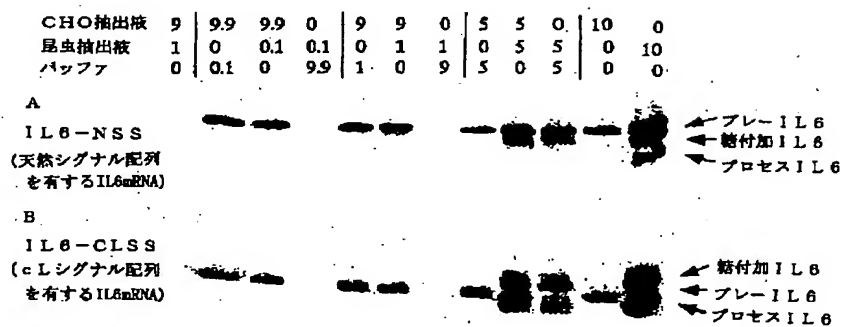
【図13】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

F. ターム(参考) 4B024 AA20 BA26 BA35 CA01 CA02
CA11 CA12 CA20 DA02 DA20
EA02 EA04 FA02 FA18 FA20
GA11 GA25 HA03 HA11
4B029 AA23 BB11 CC01
4B065 AA90X AA93Y AA97Y AA99X
AB10 AC14 AC20 BA01 BA30
BB01 BC01 BD14 BD50 CA26
CA60

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.